

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Evaluación de moxifloxacino como tratamiento alternativo en las  
infecciones por *Stenotrophomonas maltophilia*: optimización de dosis  
empleando sistemas farmacodinámicos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**David Sevillano Fernández**

Directores

**José Prieto Prieto**  
**María Luisa Gómez-Lus Centelles**

**Madrid, 2016**

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Farmacia**



**TESIS DOCTORAL**

**Evaluación de moxifloxacino como tratamiento  
alternativo en las infecciones por  
*Stenotrophomonas maltophilia*.  
Optimización de dosis empleando sistemas  
farmacodinámicos**

**David Sevillano Fernández  
Madrid, 2015**



*Coniecturalem artem esse medicinam*  
*"La medicina es el arte de suponer"*  
*(Aulio Cornelio Celso)*

*A mi esposa Eva y a mis hijos Mauro y Martina,  
mi vida y verdadera fuente de conocimiento*

*A mis padres y hermanos*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas personas que directa o indirectamente han participado en la elaboración de esta memoria.

En particular a mis directores de tesis, el Profesor José Prieto Prieto y la Profesora María Luisa Gómez-Lus Centelles, por la confianza que en su día depositaron en mí al brindarme la oportunidad de formarme como investigador en este apasionante campo de la microbiología clínica. Gracias por vuestros sabios consejos y por vuestra dedicación durante estos años.

Muy especialmente a vosotros, mis compañeros y amigos del Área de Microbiología del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina, Eva Valero Fernández, Luis Alou Cervera, Natalia González Hidalgo, Fabio Cafini Barrado, Pedro Bas Caró, Pilar Tapia, María Teresa López Casla, Olatz Echeverría Paz, Almudena Calvo Zamorano, Beatriz Laguna García-Navas, Javier Hernando Bugella e Irune Unzueta, que habéis hecho posible que finalmente, esto, diese sus frutos.

A todos vosotros,  
muchas gracias

# ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>4</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i></b>	<b>10</b>
1.1.1 Taxonomía	10
1.1.2 Características morfológicas y de cultivo	10
1.1.3 Factores de virulencia	11
1.1.4 Ecología de <i>S. maltophilia</i>	12
1.1.5 Hábitat	12
1.1.6 Portadores	13
1.1.7 Factores de riesgo	13
1.1.8 Infecciones	14
1.1.9 Métodos de tipificación en el estudio de <i>S. maltophilia</i>	16
1.1.10 Mecanismos de resistencia	17
1.1.10.1 Sistemas de expulsión activa	18
1.1.10.2 Producción de betalactamasas	20
1.1.10.3 Mecanismos de resistencia asociados a aminoglucósidos	21
1.1.10.4 Alteraciones en las topoisomerasas	21
1.1.10.5 Otros mecanismos de resistencia de relevancia clínica	22
1.1.11 Tratamiento de <i>S. maltophilia</i>	22
1.1.11.1 Opciones terapéuticas	23
1.1.11.1.1 Trimetoprim-sulfametoxazol (Cotrimoxazol)	23
1.1.11.1.2 Ticarcilina-ácido clavulánico	24
1.1.11.1.3 Carbapenemas, cefalosporinas, y aztreonam	24
1.1.11.1.4 Fluorquinolonas	25
1.1.11.1.5 Aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclinas y polimixinas	26
1.1.11.1.6 Combinaciones de antimicrobianos	27
1.1.11.2 Variabilidad de los resultados de sensibilidad dependiente del método y de las condiciones de las pruebas de sensibilidad	28
1.1.11.3 Recomendaciones al tratamiento de las infecciones por <i>S. maltophilia</i>	30
1.1.11.4 Estrategias alternativas al tratamiento convencional	32

<b>1.2 Farmacodinámica y farmacocinética-farmacodinámica de los antimicrobianos</b>	<b>34</b>
1.2.1 Concentración mínima inhibitoria (CMI)	34
1.2.2 Relación concentración-efecto de los antimicrobianos	34
1.2.3 Índices farmacocinéticos/farmacodinámicos	36
1.2.4 Magnitud del efecto antimicrobiano	37
1.2.5 Probabilidad de alcanzar la diana terapéutica	39
<b>1.3 Aplicación de la relación FC/FD en el desarrollo de antimicrobianos y en el sondeo de los puntos de corte de sensibilidad microbiológica</b>	<b>41</b>
1.3.1 Relación FC/FD en la prevención de resistencias	42
1.3.2 Modelos farmacodinámicos <i>in vitro</i> como herramientas en el pronóstico de la relación FC/FD	43
<b>1.4 Sistemas farmacodinámicos <i>in vitro</i></b>	<b>44</b>
1.4.1 Medidas del efecto antibacteriano	49
1.4.2 Cepas usadas o especies bacterianas	51
1.4.3 Dosis usadas en la aproximación FC/FD <i>in vitro</i>	51
1.4.4 Pronóstico del efecto antimicrobiano en la población sensible	52
1.4.5 Pronóstico del efecto antimicrobiano en la población resistente	53
1.4.6 Concentración preventiva de mutaciones y ventana de selección de mutaciones	54
<b>1.5 Estudio de las relaciones FC/FD en <i>S. maltophilia</i></b>	<b>55</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>56</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>58</b>
<b>3.1 Microorganismos</b>	<b>59</b>
<b>3.2. Discriminación genotípica de las cepas de <i>S. maltophilia</i></b>	<b>59</b>
<b>3.3 Sensibilidad antimicrobiana</b>	<b>61</b>
3.3.1 Métodos de sensibilidad	61
3.3.2 Estudio comparativo de la sensibilidad de <i>S. maltophilia</i> a los antimicrobianos	62
3.3.3 Antimicrobianos	62
3.3.4 Análisis de la actividad antimicrobiana puntos de corte de sensibilidad microbiológica	63
3.3.5 Influencia del método de sensibilidad y de las condiciones de incubación de la prueba en la actividad de las quinolonas	64
<b>3.4 Farmacodinámica de las fluorquinolonas frente a <i>S. maltophilia</i> en un sistema <i>in vitro</i> de microfiltración</b>	<b>65</b>
3.4.1 Sistema	65
3.4.2 Microorganismos	66



3.4.3	Experimentos FC/FD	66
3.4.4	Medidas del efecto antimicrobiano y análisis farmacodinámico	68
3.4.5	Selección de medidas del efecto y estudio de la influencia del método en el ajuste dosis-respuesta	69
3.4.6	Análisis estadísticos	70
3.4.7	Análisis de la población de <i>S. maltophilia</i> tras la exposición a dosis únicas de fluorquinolona	70
<b>3.5</b>	<b>Caracterización de los mecanismos de resistencia responsables de la pérdida de sensibilidad a fluorquinolonas</b>	<b>70</b>
3.5.1	Microorganismos	70
3.5.2	Caracterización de la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) de GyrA y ParC en las cepas recuperadas tras la exposición a quinolonas	71
3.5.3	Caracterización de los patrones de expresión de los sistemas de expulsión multidroga SmeABC y SmeDEF PCR de transcripción inversa (RT-PCR)	71
3.5.4	Estudio del efecto de los inhibidores de amplio espectro de las bombas de expulsión, reserpina y L-fenilalanina-L-arginina- $\beta$ -naftilamida en la resistencia de <i>S. maltophilia</i> a los antimicrobianos	72
<b>3.6</b>	<b>Optimización de dosis de moxifloxacino en el tratamiento de las infecciones por <i>S. maltophilia</i></b>	<b>73</b>
3.6.1	Sistema continuo de dos compartimentos	73
3.6.2	Proceso farmacocinético	76
3.6.3	Ecuaciones para el cálculo de parámetros del sistema <i>in vitro</i>	76
3.6.4	Microorganismos	77
3.6.5	Concentración preventiva de mutantes	77
3.6.6	Experimentos FC/FD	78
3.6.7	Niveles de antimicrobiano reproducidos <i>in vitro</i>	78
3.6.8	Proceso farmacodinámico: Curvas bacterianas experimentales y selección de subpoblaciones resistentes	79
3.6.9	Medidas de efecto antibacteriano y de la selección de subpoblaciones resistentes a moxifloxacino	80
3.6.10	Análisis del efecto antibacteriano	81
3.6.11	Análisis de regresión múltiple. Identificación del índice FC/FD dominante	81
3.6.12	Análisis FC/FD del efecto de moxifloxacino en la población total	81
3.6.13	Análisis FC/FD del efecto de moxifloxacino en las subpoblaciones resistentes	82
3.6.14	Probabilidad de alcanzar la diana terapéutica. Simulación de Monte Carlo	83

<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>85</b>
<b>4.1 Análisis del perfil de macrorestricción de <i>S. maltophilia</i></b>	<b>86</b>
<b>4.2 Sensibilidad de <i>S. maltophilia</i> a los antimicrobianos</b>	<b>89</b>
4.2.1 Betalactámicos	89
4.2.2 Quinolonas	89
4.2.3 Actividad de las quinolonas en cepas resistentes a ticarcilina-ácido clavulánico y/o cotrimoxazol	92
4.2.4 Aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas, cotrimoxazol y otros	94
4.2.5 Variación de la sensibilidad en función del criterio de selección de los aislados clínicos	96
4.2.6 Diferencias en la sensibilidad de acuerdo a la fuente de aislamiento	98
4.2.7 Variaciones en los resultados de sensibilidad de las quinolonas dependientes del método y de las condiciones de incubación de las pruebas	99
<b>4.3 Farmacodinámica de levofloxacin, moxifloxacin y gatifloxacin frente a <i>S. maltophilia</i> en un sistema dinámico <i>in vitro</i> de microfiltración</b>	<b>103</b>
4.3.1 Farmacocinética	104
4.3.2 Curvas de muerte bacteriana	104
4.3.3 Relación entre el efecto antibacteriano, y los parámetros farmacodinámicos CMI, AUC/CMI y T <sub>&gt;CMI</sub> de levofloxacin, moxifloxacin y gatifloxacin	107
4.3.4 Influencia del método de sensibilidad y de las variaciones del método en el ajuste dosis-respuesta de las fluorquinolonas en <i>S. maltophilia</i>	111
<b>4.4 Estudio de la población de <i>S. maltophilia</i> tras la exposición a dosis únicas de fluorquinolonas</b>	<b>114</b>
4.4.1 Perfil de sensibilidad de los organismos seleccionados tras la exposición	116
4.4.2 Caracterización de los mecanismos que confieren resistencia a quinolonas en las cepas mutantes obtenidas tras la exposición a levofloxacin y moxifloxacin	119
4.4.3 Sustituciones de aminoácidos en el QRDR de GyrA y ParC de los mutantes resistentes de <i>S. maltophilia</i>	119
4.4.4 Expresión de las bombas de expulsión SmeABC y SmeDEF en los mutantes resistentes de <i>S. maltophilia</i>	119
4.4.5 Contribución de los sistemas de expulsión SmeABC y SmeDEF en la resistencia adquirida a múltiples antimicrobianos	121
4.4.6 Relación entre la CMI, AUC/CMI y la selección de mutantes resistentes con dosis únicas de fluorquinolonas	123
<b>4.5 Efecto de los inhibidores de amplio espectro de las bombas de expulsión en la resistencia de <i>S. maltophilia</i></b>	<b>125</b>

4.5.1	Efecto de los inhibidores de amplio espectro de las bombas de expulsión en los sistemas SmeABC y SmeDEF de <i>S. maltophilia</i>	125
<b>4.6</b>	<b>Optimización de dosis de moxifloxacinó en el tratamiento de las infecciones por <i>S. maltophilia</i></b>	<b>128</b>
4.6.1	CMI y CPM	128
4.6.2	Farmacocinética e índices FC/FD	129
4.6.3	Efecto antimicrobiano	130
4.6.4	Análisis del efecto antibacteriano	133
4.6.5	Pronóstico del efecto de moxifloxacinó en la población total	134
4.6.6	Identificación del índice FC/FD dominante	137
4.6.7	Efecto de moxifloxacinó en las subpoblaciones resistentes	138
4.6.8	Selección de subpoblaciones resistentes dentro de la ventana de selección de mutaciones	141
4.6.9	Pronóstico del efecto de moxifloxacinó en las subpoblaciones resistentes	144
4.6.10	Probabilidad de alcanzar las dianas terapéuticas empleando la simulación de Monte Carlo	147
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>151</b>
<b>5.1</b>	<b>Variabilidad genética de <i>S. maltophilia</i></b>	<b>153</b>
<b>5.2</b>	<b>Sensibilidad a los antimicrobianos</b>	<b>153</b>
<b>5.3</b>	<b>Factores modificadores de la sensibilidad a los antimicrobianos</b>	<b>158</b>
<b>5.4</b>	<b>Factores metodológicos que modifican la sensibilidad a las quinolonas</b>	<b>159</b>
<b>5.5</b>	<b>Relación FC/FD en las fluorquinolonas. Factores modificadores</b>	<b>160</b>
<b>5.6</b>	<b>Farmacodinámica comparativa de las fluorquinolonas</b>	<b>162</b>
<b>5.7</b>	<b>Mecanismos que confieren resistencia a quinolonas en los mutantes resistentes</b>	<b>164</b>
<b>5.8</b>	<b>Inhibidores de las bombas de expulsión como estrategias de tratamiento</b>	<b>167</b>
<b>5.9</b>	<b>Optimización de dosis de moxifloxacinó en el tratamiento de las infecciones por <i>S. maltophilia</i> y probabilidad de éxito en los pacientes infectados</b>	<b>168</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>176</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>179</b>

# RESUMEN

*Stenotrophomonas maltophilia* es un patógeno nosocomial, emergente, cuya incidencia en procesos severos esta aumentado de manera análoga al incremento de las poblaciones de pacientes con factores predisponentes. *S. maltophilia* es un microorganismo ubicuo y adaptado a múltiples ambientes, lo que explica la elevada diversidad genética y el resistoma característico de esta especie que le confiere resistencia a la mayoría de clases de antimicrobianos. Se sugiere que el paciente porta al microorganismo en el momento del ingreso y que la combinación entre la presión antibiótica, especialmente aminoglucósidos y carbapenemas, y el profundo y prolongado estado de inmunosupresión favorecen el desarrollo de la infección. El tratamiento de las infecciones severas, bacteriemias y neumonías, es empírico, y relacionado con una elevada mortalidad, 36-67%, que es atribuida a que la mayoría de pacientes recibe una terapia inapropiada. La carencia de antimicrobianos con suficiente actividad, la rápida aparición de resistencias en los pacientes bajo tratamiento y la ausencia de ensayos clínicos que discriminen tratamientos efectivos, condicionan el complicado manejo de los pacientes infectados por *S. maltophilia*. En la actualidad solo seis antimicrobianos, cotrimoxazol, ticarcilina-ácido clavulánico, de elección y ceftazidima, levofloxacino, minociclina y cloranfenicol, son considerados tratamientos apropiados para este microorganismo por el CLSI o el EUCAST. La probabilidad de supervivencia aumenta con la rápida administración de agentes sensibles *in vitro*, pero la mortalidad continúa siendo extraordinariamente alta, 14 y el 45%, lo que demuestra la urgente necesidad de alternativas terapéuticas y de la revaloración de los actuales puntos de corte microbiológicos empleados en el pronóstico de eficacia clínica para esta especie.

El objetivo principal de esta memoria ha sido la evaluación de moxifloxacino como tratamiento alternativo, estableciendo esquemas de dosificación que pronostiquen el éxito clínico en los pacientes infectados, sin riesgo de selección de resistencias durante el tratamiento. Como objetivos secundarios se valoraron los factores modificadores de la actividad *in vitro* y de la relación dosis-respuesta y el criterio pronóstico de los actuales puntos de corte microbiológico comparado con la relación farmacocinética-farmacodinámica. Para ello, primero se analizó comparativamente la actividad de moxifloxacino con otras clases de antimicrobianos en aislados clínicos no relacionados genéticamente procedentes de diferentes centros hospitalarios de nuestra geografía, en segundo lugar se valoró comparativamente la actividad dinámica y el riesgo de selección de resistencias de dosis convencionales de moxifloxacino y otras fluorquinolonas en un sistema farmadínámico de microfiltración, en tercer lugar, se caracterizaron los mecanismos que confieren resistencia adquirida a las quinolonas en los mutantes resistentes y en cuarto lugar se examinaron diferentes estrategias de tratamiento basadas por un lado en la combinación de las fluorquinolonas con inhibidores de amplio espectro de las bombas de expulsión y por otro en la optimización de la dosis que previenen del desarrollo de resistencias empleado escalamiento y fraccionamiento de la dosis de 400 mg de

moxifloxacino en un sistema farmacodinámico de dos compartimentos y la probabilidad de éxito en los pacientes infectados mediante simulaciones de Monte Carlo.

Según el estudio de sensibilidad, moxifloxacino, con cerca del 90% de cepas sensibles, y algunas fluorquinolonas o la combinación cefepima-ácido clavulánico o minociclina, doxiciclina o tigeciclina serían alternativas más razonables que los actuales tratamientos de elección, los cuales mostraron una resistencia inaceptable ( $>35\%$ ). La sensibilidad no se afecta por la introducción de aislados repetidos en las series estudiadas o en función del origen clínico de los aislados, pero sí significativamente dependiendo del método de sensibilidad y los criterios de interpretación de la CMI utilizados. Los resultados muestran que la prolongación de la incubación de la prueba de sensibilidad hasta las 48 horas aporta un cierto criterio pronóstico de desarrollo de resistencias en aislados clínicos que podrían sobreexpresar bombas de expulsión multidroga durante el tratamiento y por lo tanto sería recomendado incluirlo en el método de referencia para todas las clases de antimicrobianos, excepto betalactámicos. La comparación de diferentes métodos en la sensibilidad para las fluorquinolonas reveló que la dilución en agar con la interpretación de la CMI tras 48 horas de incubación sería de elección debido a que aunque la correlación de los resultados entre métodos es muy pobre ( $r < 0,65$ ), este método pronosticaría más adecuadamente la respuesta clínica que la dilución en agar de acuerdo al estándar del CLSI (21 a 170 veces) o que la microdilución en caldo o el E-test ( $>1000$  veces).

Moxifloxacino sería de elección de entre las fluorquinolonas disponibles para la práctica clínica al demostrar una relación farmacocinética-farmacodinámica más favorable y un menor riesgo de aparición de resistencias, en comparación. Los mutantes resistentes se seleccionaron muy rápidamente empleando dosis convencionales de fluorquinolonas y exhibieron un fenotipo de resistencia cruzada a quinolonas y otras clases de antimicrobianos no relacionados estructuralmente, incluyendo cotrimoxazol. La mayoría de estos mutantes resistentes sobreexpresaron los sistemas SmeDEF y o SmeABC y un reducido número sobreexpresó un sistema de expulsión compatible con SmeVWX. La resistencia adquirida a quinolonas no se encontró asociada con mutaciones específicas en las topoisomerasas II y IV.

Los inhibidores de amplio espectro de las bombas de expulsión, reserpina y PA $\beta$ N no restauraron la sensibilidad de las cepas progenitoras. Se observaron reducciones muy limitadas en algunos mutantes, probablemente relacionadas con la inhibición de otros sistemas de expulsión, no identificados en esta memoria, que contribuyen minoritariamente en la resistencia adquirida.

El escalamiento y fraccionamiento de dosis de moxifloxacino en el sistema farmacodinámico de dos compartimentos, permitió identificar mediante regresión lineal múltiple, que el AUC/CMI es el índice FC/FD que dirige, exclusivamente, la respuesta antibacteriana de moxifloxacino en esta especie. Este efecto, según los modelos de efecto mixto generados fue diferente con el aumento de la dosis (o AUC/CMI expuesto) y diferente con el aumento de la resistencia del organismo, pero no cuando moxifloxacino se combinó con el inhibidor de las bombas PA $\beta$ N,

independientemente de la dosis simulada o de la sensibilidad o de los mecanismos de resistencia presentes en los aislados clínicos o mutantes resistentes.

La relación entre la respuesta antibacteriana (AUBKC o r24h) y el cociente AUC/CMI se describió adecuadamente empleando un modelo inhibitorio de efecto máximo ( $r^2=0,91-0,95$ ). Un cociente AUC/CMI de 68 horas (AUC/CMI<sub>80</sub>), equivalente a reducción de la carga bacteriana  $\geq 4$  log UFC/ml tras la exposición, fue identificada como la magnitud que pronosticaría la respuesta clínica de moxifloxacino. No obstante esta magnitud fue relacionada con la posible selección de resistencias durante el tratamiento, cuando el análisis farmacocinético-farmacodinámico se desarrolló incluyendo el efecto antibacteriano de moxifloxacino en las subpoblaciones resistentes empleando medidas basadas en la aparición de resistencias ( $N_r/N_i$ , AUC-PAP<sub>r</sub>/AUC-PAP<sub>i</sub>). Esta aparición de resistencias fue consistente con la hipótesis de la ventana de selección de mutaciones según la cual la selección de resistencias ocurre cuando las concentraciones de expuestas se sitúan entre la CMI y la concentración preventiva de mutantes durante un porcentaje del periodo de dosificación ( $T_{VSM}$ ). Tanto el cociente AUC/CMI como  $T_{VSM}$  describieron un patrón en U invertida con las medidas de resistencia que fue adecuadamente descrito a partir de ecuaciones tipo Gauss. Un cociente AUC/CMI de 108 horas (MSR) o un  $T_{VSM}$  fuera de la VSM  $>63\%$  para exposiciones con un  $T > CPM > 0$ , evitaría la selección de resistencias.

De acuerdo a esta MSR, el punto de corte farmacodinámico para moxifloxacino en *S. maltophilia* sería de  $\leq 0,25$  µg/ml, muy inferior al punto de corte microbiológico adoptado de especies relacionadas para cepas sensibles ( $\leq 1$  µg/ml), y la probabilidad de éxito en los pacientes infectados, aunque dependiente de los patrones locales de sensibilidad, sería inferior al 40%, 58% y 83% con dosis de 400 mg, 800 mg o 400 mg atendiendo a la disposición de concentraciones en tejido pulmonar.

En conclusión, la aproximación farmacocinética-farmacodinámica *in vitro* establece esquemas de tratamiento efectivos y la probabilidad de éxito del tratamiento en los pacientes infectados y suple la ausencia de ensayos clínicos que demuestren la eficacia de los tratamientos disponibles en especies complicadas desde un punto de vista clínico-terapéutico como lo es *S. maltophilia*. El riesgo de resistencias reduce las expectativas clínicas de las fluorquinolonas y cuestiona el pronóstico de eficacia de los actuales puntos de corte microbiológico, los cuales deberían fundamentarse en la aproximación farmacocinética-farmacodinámica basada en la relación entre la exposición de antimicrobiano y la aparición de resistencias. Las expectativas fundadas en torno a los tratamientos considerados "apropiados" frente a *S. maltophilia* se reducirían sustancialmente y los puntos de corte microbiológico que pronostican su eficacia clínica deberían redefinirse, de aplicar aproximaciones simulares a la presentada en esta memoria para moxifloxacino.

# SUMMARY

*Stenotrophomonas maltophilia* is an emerging nosocomial pathogen which has been increasingly reported as a cause of life-threatening infections, in particular in populations of patients with predisposing factors, such as immunosuppression, neutropenia or antimicrobial pressure. *S. maltophilia* is a ubiquitous gram-negative bacillus that has been isolated from humans, animals, soil, food, and pharmaceuticals. Because of this adaptation to different habitats, *S. maltophilia* shows great genetic diversity and a particular resistome which confer resistance to virtually all classes of antimicrobial agents. It has been suggested that patients might carry a strain at the time of admission to the hospital and the combined action of antibiotic pressure plus profound and prolonged immunodepression may favour the development of infection. Treatment of severe infections, bacteraemia and pneumonia is often empiric and it is associated to high mortality rates (36-67%) as a consequence that the majority of patient did not receive adequate empiric antibiotic therapy. The lack of agents that have significant activity against *S. maltophilia*, the rapid emergence of resistance in patients under therapy and the absence of clinical trial to select reasonable therapies determine the managing of infected patients. Currently, cotrimoxazole and ticarcillin-clavulanic acid, as drugs of choice, and ceftazidime, levofloxacin, and chloramphenicol are the only agents recommended as appropriate treatments for this microorganism by CLSI or EUCAST. Although patient survival increases with the rapid administration of an antimicrobial agent to which the strain is *in vitro* susceptible, the mortality remains too high (14-45%), indicating that therapeutic options are urgently required and an assessment of current accepted breakpoint to predict clinical success against this microorganism.

The aim of this study was the evaluation of moxifloxacin as alternative treatment against *S. maltophilia* infections, and to establish the optimal dosing regimen associated with clinical efficacy without risk of emergence of resistance under therapy. As secondary objectives, we evaluated (i) modifying aspects of the *in vitro* activity and the relationship between dose and response, and (ii) ability of microbiological breakpoints compared to the pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship to predict clinical success. First, the moxifloxacin activity was compared to other antimicrobials in unrelated genetically clinical isolates obtained from different Spanish hospitals. Second, we compared the pharmacodynamic activity and the risk of emergence of resistance for moxifloxacin and other fluoroquinolones in a microfiltration pharmacodynamic system. Third, we characterized the mechanisms that confer acquired resistance to quinolones in resistant mutants. And finally, we studied different strategies of treatment (i) based in fluoroquinolone combination with inhibitors of the efflux pumps, and (ii) based in the optimization of the moxifloxacin doses that prevents the emerge of resistance using ranging and fractionation of the 400 mg moxifloxacin dose in a pharmacodynamic system of two compartments. Additionally, we establish the probability of clinical success in infected patients treated with moxifloxacin using MonteCarlo simulation.

In the susceptibility studies, moxifloxacin with a 90% of susceptible strains, some fluoroquinolones, the cefepime-clavulanic acid combination, minocycline, doxycycline or tigecycline could be more reasonable alternatives than the current treatments of choice, which showed high percentage of resistance (>35%). Susceptibility was not affected by the inclusion of repeated isolates in our series or isolation source of the clinical isolate, but was affected significantly by the susceptibility method and the interpretation criteria of the MIC used.

Results showed that the 48 h incubation of the susceptibility test provides a prediction criterion of the emergence of resistance in clinical isolates that could overexpress multidrug efflux pumps during treatment. Therefore, it would be recommended to include in the standard method for all classes of antimicrobials except betalactams. Comparison of the different susceptibility methods for the fluoroquinolones revealed that the agar dilution with a MIC reading at 48 h incubation would be more appropriated. This method would predict more accurately the clinical response than the agar dilution according CLSI standards (21 to 170 times) or than the broth microdilution or E-test (>1000 times) despite the low correlation among method ( $r < 0.65$ ).

Moxifloxacin, which demonstrates a more favorable pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship and a lower risk for emergence of resistance, would be of choice among available fluoroquinolones for clinical practice. The emergence of resistant mutant occurred rapidly using common fluoroquinolone doses. Mutants exhibited resistance to quinolones and to other antimicrobial classes not structurally related, including cotrimoxazole. The majority of mutants overexpressed the SmeDEF and or SmeABC efflux pump systems and a reduced number of mutants displayed a resistant phenotype compatible with SmeVWX. Mutations in topoisomerases II and IV QRDRs were not relevant for quinolone resistance.

Using the two-compartment pharmacodynamic system and dose scaling and fractionation of moxifloxacin we identified by multiple regression analysis that AUC/MIC was the best individual predictor of the moxifloxacin antibacterial effect. The mixed effect model explained that the antibacterial effect of moxifloxacin was different at different doses and at different MIC but not when moxifloxacin was combined with the efflux pump inhibitor PABN. The antibacterial effect (AUBKC or  $r_{24h}$ ) was adequately related to the AUC/MIC ratio using an inhibitory sigmoidal Emax model ( $r^2 = 0.91-0.95$ ). An AUC/CMI value of 68 hours (AUC/CMI<sub>80</sub>) which was associated with a  $\geq 4$ -log CFU/ml reduction in viable counts, was identified as the magnitude required for efficacy. However, this magnitude did not directly reflect the selective enrichment of resistant mutants. Our study suggests that emergence of resistant mutant of *S. maltophilia* occur at concentrations that fall into the mutant selection window (MSW) i.e. above the MIC and below the mutant prevention concentration, during a percentage of time of dosing interval ( $T_{MSW}$ ). AUC/MIC ratio or  $T_{MSW}$  relationships with the emergence of resistance (as expressed by AUC-PAP<sub>f</sub>/AUC-PAP<sub>i</sub> or  $N_f/N_x$ ) were reflected by an inverted U shape curve and were fitted by a Gauss type equation. An AUC/CMI value of 108 hours (MSR magnitude) or a  $T_{VSM} > 63\%$  for doses with a  $T > CPM > 0$  might protect against *S. maltophilia* resistance.



According to MSR magnitude, the pharmacodynamic breakpoint for moxifloxacin in *S. maltophilia* was established in  $\leq 0.25$   $\mu\text{g/ml}$  and the probability of clinical success in infected patients, although dependent on the local surveillance patterns, was lower than 40%, 58%, and 83% for doses of 400 mg, 800 mg, and 400 mg taking into account the moxifloxacin tissue concentrations, respectively.

In conclusion, *in vitro* pharmacokinetic-pharmacodynamic approach is essential to replace the lack of clinical trial comparing the efficacy of available treatments against species for which the treatment is extremely complicated and it sets the probability of clinical success in infected patients. The risk of emergence of resistance reduces clinical prospect for fluoroquinolones against *S. maltophilia* infections and put into question the current available microbiological breakpoints, which should be based on the relationship between drug exposition and emergence of resistance. These expectations would be probably also extensible to the current antimicrobials recommended as appropriate for the treatment of this microorganism applying similar approaches than those used herein for moxifloxacin.

# ABREVIATURAS

%CV: Coeficiente de variación

$\chi^2$  : Test de la chi-cuadrado

µg: microgramos

µm: micrómetros

µM: micromol

ABC: Área bajo la curva=AUC

ADN: Ácido desoxinucleico

ANOVA: Análisis de la varianza

ARN: Ácido ribonucleico

ATCC: Cepa estándar (American Type Control Collection)

AUBKC: Área bajo la curva de la muerte bacteriana

AUC/CMI: AUC relativo a la CMI

AUC/CPM: AUC relativo a la CPM

AUC<sub>inf</sub>: Área bajo la curva extrapolado al infinito; obs: observada, pred: pronosticada

AUC-PAP: Área bajo la curva del análisis del perfil de la población

CIA: Criterio Informativo de Akaike

Cl: Aclaramiento

ClNa: Cloruro sódico

CLSI: Clinical Laboratory Standard Institute

C<sub>max</sub>/CMI: cociente inhibitorio (número de veces que los niveles máximos supera la CMI)

C<sub>max</sub>= Concentración máxima

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub>: Concentración que inhibe al 50 y 90% de la población respectivamente

C<sub>min</sub>: Concentración mínima

CPM: Concentración preventiva de mutaciones

EC<sub>50</sub>, EC<sub>80</sub>, EC<sub>90</sub>: Concentración necesaria para conseguir el 50%, 80% o 90% del efecto máximo

EDTA: Ácido etilendiaminotetraácetico

E<sub>max</sub>, E<sub>min</sub>: Efecto máximo y mínimo

EMA: European Medicines Agency

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FC/FD: farmacocinética/farmacodinámica

FDA: Food and Drug Administration

K<sub>a</sub>: Constante de absorción

Kb: Kilobase

Kda: Kilodalton

$K_e$ : Constante de eliminación  
 $K_m$ : constante de hidrólisis  
 $\ln$ : Logaritmo neperiano  
 $\log$ : logaritmo decimal  
 $\log_2$ : logaritmo en base 2  
LRE: Líquido de revestimiento epitelial pulmonar  
 $Mg^{+}$ : ión magnesio  
MHS: Mueller-Hinton suplementado con cationes  
MHSS: Agar Mueller-Hinton suplementado con un 5% de sangre de carnero  
min: minutos  
ml: mililitro  
mM: milimoles  
MSR: máxima o completa supresión de resistencias  
 $O_2$ : Oxígeno  
p.o.: vía oral  
PAP: Perfil del análisis poblacional  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
PFGE: Electroforesis en campo pulsante  
QRDR: regiones determinantes de la resistencia a quinolonas  
 $r_{24h}$ : diferencia en log UFC/ml al tiempo señalado con respecto al inóculo de partida  
RII: Reducción porcentual del inóculo inicial  
 $r_{max}$ : efecto máximo (relativo a muerte bacteriana)  
RT-PCR: PCR de transcripción inversa  
S: segundos  
Sma: *Stenotrophomonas maltophilia*  
Sme: Stenotrophomonas multidrug efflux  
 $T_{>CMI}$ : Tiempo que las concentraciones se sitúan por encima de la CMI  
 $T_{1/2}$ : semivida de eliminación  
 $T_{90\%}$ ,  $T_{99\%}$ ,  $T_{99,9\%}$ : Tiempo en alcanzar una reducción del 90, 99 o 99% en el inóculo inicial  
TBE: Tampón tris clorhídrico-edetato sódico  
TE: Tampón tris clorhídrico-Ácido etilendiaminotetraacético  
 $T_{max}$ : Tiempo máximo  
 $T_{VSM}$ : Tiempo dentro de la ventana de selección de mutaciones  
UCI: Unidad de cuidados intensivos  
UFC: Unidades formadoras de colonias  
UPGMA: Método algoritmo de agregación jerárquica  
 $V_d$ : Volumen de distribución  
VSM: ventana de selección de mutaciones  
 $Zn^{2+}$ : ión zinc

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1 *Stenotrophomonas maltophilia*

### 1.1.1 Taxonomía

Se piensa que fue en 1887 cuando Broker aisló por primera vez a este microorganismo en un proceso diarreico infantil (1). Casi un siglo después, 1958, Hugh aisló el microorganismo actualmente considerado tipo (ATCC 13637) en un paciente con carcinoma oral, pero no fue hasta 1961 cuando se procedió a su descripción taxonómica donde recibió el nombre de *Pseudomonas maltophilia* (2). En 1983 Swings y cols., estudian la homología en los cistrones de ARNr entre la cepa ATCC 13637 y diversas cepas del género *Xanthomonas*, así como otros datos genotípicos y fenotípicos (3). El contenido en guanina y citosina (G+C), *P. maltophilia* 63-67,5%, *Xanthomonas* 63-70%, la ausencia de NADP-deshidrogenasa y las ocho unidades de isopreno que constituyen las ubiquinonas frente a las nueve unidades presentes en las diferentes especies de *Pseudomonas*, y la composición semejante en ácidos grasos celulares y las proteínas de membrana externa permitió transferir a este microorganismo al género *Xanthomonas*. Este acontecimiento obligó a redefinir el género *Xanthomonas*, hecho que no fue completamente aceptado por todos. Las profundas diferencias fenotípicas existentes, como el número de flagelos, tipo de fimbrias, presencia de exopolisacáridos aniónicos, reducción de nitratos, hidrólisis de quitina, resistencia a algunos antimicrobianos, y el análisis en la composición de los ácidos grasos hace cuestionar de nuevo su estado taxonómico (4). Finalmente en 1993 fue aceptada la propuesta de Palleroni y Bradbury para crear un nuevo género, *Stenotrophomonas*, que incluiría a este único representante, *Stenotrophomonas maltophilia* [del griego, *stenos*: estrecho, *trophos*: que se alimenta, *monas*, unidad que se alimenta de pequeños sustratos; del inglés antiguo, *malt*, malta y del griego *philia*, afinidad; afinidad por la malta (5)]. Las diferencias existentes en el mapa de restricción de los genes ARNr 16s con las *Xanthomonas* fue definitivo para aceptar la propuesta (6). *S. maltophilia* ha sido su único representante hasta 1997 cuando se incorporó una nueva e infrecuente especie, *Stenotrophomonas africana*, bioquímicamente casi idéntica a *S. maltophilia*. Sin embargo dada la baja homología el ADN de ambas especies, 35%, puede que esta última tenga que ser redefinida (7).

### 1.1.2 Características morfológicas y de cultivo

*S. maltophilia* es un bacilo gramnegativo, aerobio obligado, no esporulado, que aparece como un bacilo recto o ligeramente curvado de forma individual o en parejas. Es relativamente pequeño (0,5-1,8  $\mu\text{m}$  de largo), con varios flagelos polares que le confieren movilidad y sin depósitos de poli-beta-hidroxi-butilato. Las colonias son lisas, brillantes y bien delimitadas, de un color que varía del blanco a amarillo pálido o tonalidades verde amarillentas. Su olor es amoniacal. No suele producir betahemólisis, aunque en agar sangre puede ocasionar una decoloración verdosa en las zonas de crecimiento. No crece a temperaturas menores de 5°C ni

mayores de 40°C. La temperatura óptima de crecimiento es 35°C aunque crece perfectamente en el intervalo de 20-35°C tanto en atmósferas de O<sub>2</sub> como al 5% de CO<sub>2</sub>.

Aunque se trata de un microorganismo metabólicamente poco activo, es capaz de hidrolizar sustratos tan inusuales como la estreptomicina, por lo que muchas cepas de esta especie se han investigado como agentes biodegradantes (8).

Entre las pruebas bioquímicas claves para su identificación, se encontrarían la de la oxidasa, la oxidación de la glucosa y maltosa y la producción extracelular de DNA-asa que a veces tarda en detectarse 48-72 horas, todas ellas negativas y las de la presencia de catalasa, lisina descarboxilasa, hidrólisis de esculina, gelatina y de tween 80, positivas en el 80% de las cepas.

La presencia de antígenos somáticos O (hasta 31 diferentes) y flagelares H o el contenido peculiar en ácidos grasos, ácido 13-metil-tetradecanoico, más del 30%, ácido 12-metil-tetradecanoico, 10% y ácido cis-9-hexadecenoico, permiten disponer de métodos alternativos para la identificación del microorganismo y la realización de estudios epidemiológicos.

### 1.1.3 Factores de virulencia

Se conoce muy poco de los factores de virulencia de *S. maltophilia* y de hecho es difícil diferenciar los casos de colonización de los casos de infección lo que ha llevado a creer que se trata de un microorganismo de limitada patogenicidad. Diversos estudios muestran la falta de asociación existente entre presencia de infección y desenlace. Se ha sugerido que *S. maltophilia* produce infección cuando actúa de forma sinérgica con otros patógenos (9) aunque otros autores (10) no encontraron diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes que presentaron cultivos mixtos o puros del microorganismo. Estas hipótesis explicarían el limitado número de estudios con animales de experimentación existentes con este microorganismo en los que según parece, inóculos muy elevados administrados por vía intraperitoneal no causan sepsis severas. *S. maltophilia* puede producir ADNasa, ARNasa, fibrinolisisina, lipasas, hialuronidasas, proteasas y elastasas. Las dos últimas se sintetizan en grandes cantidades y parecen tener un papel semejante al de las exoenzimas en *Pseudomonas aeruginosa* en la patogénesis del estigma gangrenoso (8).

Tanto las cepas clínicas como las ambientales tienen la propiedad de adherirse a diversos tipos de materiales plásticos, incluidos los catéteres de acceso venoso o vidrio donde parece jugar un papel determinante la carga positiva de la membrana externa de las cepas de *S. maltophilia* a pH fisiológico.

Sobrevive y se multiplica fácilmente en infusiones endovenosas, incluida la nutrición parenteral, lo que contribuye a la patogénesis de las infecciones asociadas a catéteres intravenosos. También puede crecer en los fluidos de diálisis y comportarse como pirógeno de bajo peso molecular durante la hemodiálisis. Las proteínas fijadoras de IgG tienen aún un papel poco conocido en la patogénesis de la infección por *S. maltophilia*. La resistencia al suero es una característica que muestran muchos bacilos gramnegativos causantes de septicemia, y en un

estudio realizado con un pequeño número de cepas de *S. maltophilia* se observó que los aislamientos clínicos mostraban esta propiedad con mayor frecuencia que los ambientales.

#### **1.1.4 Ecología de *S. maltophilia***

Aunque *P. aeruginosa* continúa siendo el patógeno gramnegativo no fermentador, mayoritariamente encontrado en el entorno hospitalario, los datos actuales confirman un aumento en la incidencia de *S. maltophilia* y *Acinetobacter baumannii* desde principios de la pasada década (11). Concretamente entre 1970 y 1980 se ha observado un aumento en la incidencia de este patógeno en hospitales oncológicos americanos desde 7,1 a 37,7 pacientes por cada 100.000 altas (10,12). En hospitales franceses se detectaron incrementos desde un 20 a un 65% (13) entre 1991 y 1993. Los datos del EPIne en España no contemplan cifras para este microorganismo, aunque de forma similar a lo observado en otros países, el incremento de aislamiento de acuerdo al avance tecnológico en la medicina ha de ser también evidente en nuestro país.

La mortalidad asociada a este patógeno oscila entre el 14-69%, aunque es difícil atribuirle en todos los casos a la infección per sé del patógeno, ya que las enfermedades de base presentadas por los pacientes contribuyen claramente a esta elevada tasa (14,15).

El aumento de una población que presenta los factores de riesgo, pacientes con quimioterapia intensiva por sus neoplasias o con la inmunosupresión necesaria para la prevención de los rechazos de los órganos trasplantados, facilitan la infección por *S. maltophilia*. Este hecho unido a la utilización de dispositivos de acceso intravascular y una mayor disposición de antimicrobianos de amplio espectro que le aportaría ventajas ecológicas por su carácter de multirresistencia, explicarían el aumento producido en el aislamiento de este patógeno.

#### **1.1.5 Hábitat**

*S. maltophilia* es un microorganismo ubicuo, con una amplia distribución geográfica, aunque su hábitat fundamental es el acuático. Se ha aislado en aguas de ríos y lagos, aguas residuales, plantas (hierbas, vegetales, madera) y alimentos (pescado congelado, leche o huevos de ave de corral). Tiene un efecto inhibitor de hongos fitopatógenos y se ha investigado su utilización contra plagas en agricultura. También se ha comunicado su efecto inhibitor del crecimiento de hongos como *Candida spp.*, y *Aspergillus fumigatus*. Esta inhibición puede ser debida a la producción de pirrolnitrina, que se ha sugerido que tiene actividad citolítica o de maltophilina, sustancia lactónica macrocíclica con actividad antifúngica contra aislamientos saprofitos, fitopatógenos y humanos (16,17). Se ha aislado también como contaminante de cultivos de laboratorio y en una gran variedad de superficies y objetos hospitalarios, como tubos de muestras de sangre, monitores de presión venosa y arterial, sistemas para el cuidado de lentes de contacto, distribuidores de agua desionizada, máquinas de diálisis, soluciones desinfectantes, equipos de terapia inhalatoria y nebulizadores, analizadores de oxígeno, humidificadores de oxígeno, desagües y grifos, y en ocasiones en manos del personal sanitario

etc. Es posible que aparezca en el ambiente doméstico, y de hecho es de vital importancia en los domicilios de pacientes con fibrosis quística (18). En un estudio se detectó el microorganismo en un 36% de las muestras procedentes de domicilios de pacientes colonizados y en un 42% de las muestras de domicilios de pacientes no colonizados (6).

El aislamiento del microorganismo a partir de superficies secas es más raro (19) (Moffet, 1967). Al contrario de otras bacterias gramnegativas, carece de proteínas similares a la albúmina sérica bovina que aumente supervivencia en ambientes secos (20).

#### **1.1.6 Portadores**

Existen pocos estudios que reflejen al humano como posible portador de *S. maltophilia* y los resultados obtenidos hasta la fecha son contradictorios. Algunos autores han demostrado su presencia en heces (2,16) y exudados orofaríngeos (8) aunque otros autores no confirman este aspecto (21).

Khardori y cols en un brote nosocomial por *S. maltophilia* no detectaron al microorganismo en los exudados faríngeos del personal sanitario, aunque sí estuvieron presentes en algunos de los enfermos (22). En algunos brotes nosocomiales causados por el microorganismo este se ha encontrado en las manos del personal sanitario (9,23), pero no en otros (22).

Se desconocen las fuentes animales en las que se puede encontrar el microorganismo, su aislamiento se ha podido concretar en pescados, carne cruda de vaca y oveja, leche, heces de conejos, lagartijas, boca y recto de reptiles y en el tracto gastrointestinal de animales de laboratorio (8). Se ha implicado en la putrefacción de la lana de oveja y se ha encontrado incluso en nematodos (8). Se asume que la transmisión del microorganismo se encuentra estrechamente ligada al ambiente hospitalario y sin embargo existen pocos estudios donde se demuestre su transmisión nosocomial, incluyendo los casos de brotes (8). Varios estudios destacan que la transmisión en la comunidad podría ser más frecuente de lo estimado (entre un 24-50% de los aislamientos) (24,25). La vía de entrada de *S. maltophilia* es frecuentemente desconocida aunque se piensa que la hospitalización prolongada y la antibioterapia de amplio espectro podrían seleccionar al microorganismo a partir de la localización respiratoria o gastrointestinal de cada paciente o a partir de fuentes ambientales. Estos hechos explicarían su elevada diversidad genética (6).

#### **1.1.7 Factores de riesgo**

La inmunodepresión de diferente naturaleza y enfermedades previas subyacentes: enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cardiovasculares, hepatobiliar, trasplante, diálisis, VIH, diabetes mellitus, drogadicción, tabaco, alcoholismo son factores de riesgo intrínseco a la infección (16). Un factor especialmente asociado a la adquisición por *S. maltophilia* es la presencia de neoplasias destacando entre ellas, las leucemias agudas y el carcinoma de mama. Como factores de riesgo extrínsecos se han identificado la presencia de catéteres vasculares, ventilación asistida o traqueotomía, técnicas diagnósticas invasivas, hospitalización prolongada



y estancia en UCI, quimioterapia citotóxica, corticoides y muy especialmente la exposición previa a antibioterapia de amplio espectro (9,26,27).

La neuropatía crónica y la ventilación asistida en UCI, edad superior a los 40 años y el aislamiento del germen a nivel pulmonar, son factores de riesgo asociados con el aumento de la mortalidad por *S. maltophilia* (28). Según estos mismos autores, la neumonía postventilación supone de por sí, un criterio pronóstico de la mortalidad de este microorganismo. En un estudio más reciente desarrollado sobre pacientes con bacteriemias, se ha observado que la prolongación de la estancia hospitalaria, la extensa permanencia en UCI, la necesidad de ventilación mecánica y el shock séptico fueron factores de riesgo potencialmente asociados con la mortalidad producida.

La exposición previa a antimicrobianos de amplio espectro particularmente carbapenemas ha sido relacionada con la aparición de infecciones por *S. maltophilia* en unidades de cuidados intensivos, trauma y otras poblaciones (29-31).

Algo más discutida es la identificación de una administración inapropiada de terapias frente a *S. maltophilia* como factor de riesgo asociado. Aunque algunos autores no han observado diferencias estadísticamente significativas (32), en al menos dos estudios caso-control se ha determinado que la administración de terapias inapropiadas es un factor de riesgo independiente asociado con el aumento de la mortalidad producida por *S. maltophilia* (33,34). Metan y cols, precisaron que la mortalidad asociada a pacientes que recibieron una terapia inapropiada fue significativamente superior, 70% vs. 17%, a la de aquellos que recibieron una terapia apropiada dentro de las 24 primeras horas de obtener un cultivo sanguíneo positivo (31).

Otro grupo afectado por este microorganismo son los pacientes con fibrosis quística. Las secreciones producidas por estos pacientes constituyen un nicho ecológico magnífico para la colonización crónica del microorganismo. El paciente con fibrosis quística engloba a una población sometida a antibioterapia de amplio espectro, con varios regímenes anuales de antibióticos, y con hospitalizaciones frecuentes, y de forma añadida, las infecciones pulmonares previas y la enfermedad crónica respiratoria. En estas condiciones el incremento de la resistencia de los microorganismos acomodados en estos enclaves y la aparición de microorganismos que manifiesten multirresistencia intrínseca, es un fenómeno generalizado.

### **1.1.8 Infecciones**

*S. maltophilia* puede ser aislado en pacientes hospitalizados sin clínica aparente por lo que resulta complicado relacionar la presencia del microorganismo con colonización o infección (8), especialmente cuando de manera frecuente se acompaña del aislamiento de otros microorganismos (8,35). En principio, dependiendo de la localización del aislamiento y teniendo en cuenta especialmente las enfermedades de base que presenta el paciente, se puede diferenciar entre infección y colonización (8,36,37). En muchos casos la distinción depende de

la exigencia de los criterios establecidos por los diferentes autores que lógicamente limita la capacidad patogénica real del microorganismo.

La principal manifestación clínica de *S. maltophilia* es la neumonía, en especial en pacientes con ventilación mecánica, traqueotomía o con necesidades de tratamientos mediante nebulizadores, de polimixina oral o antimicrobianos de amplio espectro. En la mayoría de los pacientes existe un deterioro pulmonar previo, consecuencia de la EPOC, bronquiestasias, obstrucción endobronquial y trasplante pulmonar. Los aislamientos de *S. maltophilia* en esta localización oscilan según los estudios en el intervalo del 40-89% (13,14,22-24,28,38), y generalmente lo hace como un microorganismo colonizador en el 51-73% de los casos (24). La colonización del tracto respiratorio es común en pacientes con fibrosis quística, traqueotomizados, con ventilación mecánica, pacientes de larga duración en unidades de cuidados intensivos y con tratamiento antimicrobiano prolongado (15).

*S. maltophilia* es el responsable del 5% de las neumonías hospitalarias y en raras ocasiones provoca infecciones del tracto respiratorio superior. Si bien la neumonía nosocomial asociada o no a brotes (9,24,38), se encuentra mejor relacionada con el microorganismo, no hay que descartar la posibilidad de que pueda causar neumonías adquiridas en la comunidad, la mayoría, en pacientes con circunstancias predisponentes (39). La fuente de la que los pacientes adquieren el microorganismo no se encuentra bien constatada. Aunque ha sido aislada de circuitos de ventilación mecánica puede que solo signifique una contaminación desde los pacientes infectados (40,41).

Los pacientes con fibrosis quística son un grupo de enfermos en los que la prevalencia de la infección se ha incrementado notablemente (10-30%) (42-44). El origen de este incremento es multifactorial pero las terapias antipseudomonas prolongadas y la administración de corticosteroides orales juegan un papel determinante. Algunos estudios destacan el deterioro de la función pulmonar, particularmente en aquellos pacientes colonizados crónicamente durante largos periodos de tiempo (43,45,46).

La bacteriemia es otra manifestación común de la infección por *S. maltophilia* asociado a dispositivos intravasculares o secundaria a infecciones respiratorias, gastrointestinales y urinarias. Se han descrito brotes originados por piezas contaminadas en la reutilización de sistemas de hemodiálisis, de sistemas de monitorización de la presión y por estancias en una misma habitación (8,47). La tasa de mortalidad atribuida al microorganismo es elevada, 41% (8,48), y según algunos estudios no parece haber diferencias entre las infecciones poli y monomicrobianas (27-29). La mortalidad se encuentra asociada a factores relacionados con la patología de base del paciente, como la neutropenia severa y la gravedad de la enfermedad de base y principalmente al uso asociado de un tratamiento antimicrobiano no adecuado (15,48). En la bacteriemia asociada a catéter la retirada del dispositivo es fundamental para obtener un resultado clínico favorable (29).

La endocarditis o la infección del sistema nervioso central son manifestaciones raras. Los escasos reportes de endocarditis se asocian a los factores de riesgo típicos de esta patología,

antecedentes de cirugía cardíaca, adicción a drogas parenterales, dispositivos intravasculares, extracción o manipulación dentaria o citoscopia. El pronóstico es variable y la mortalidad cercana al 39% (8,29).

La meningitis suele aparecer de forma espontánea en niños y neonatos y secundaria a procedimientos quirúrgicos en adultos (49,50).

*S. maltophilia* es aislado con cierta frecuencia en muestras de orina, pero su papel como patógeno es desconocido, por lo que se podría decir que es una causa infrecuente de infección (22,51). Cuando ocurre suele ser de origen nosocomial y generalmente asociada a patología estructural del tracto urinario, a cirugía o instrumentalización incluido el sondaje urinario (22,51).

Algunos individuos pueden ser portadores gastrointestinales asintomáticos de *S. maltophilia*, aunque también suele ser causa rara de infección del tracto digestivo. Los más importantes son las peritonitis en pacientes en diálisis crónica peritoneal ambulatoria (52-54). Pueden ser secundarias a la infección local de la inserción de la cánula, precisan en la mayoría de los casos la retirada del catéter y tratamiento antimicrobiano intravenoso.

*S. maltophilia* es frecuentemente aislado de heridas y otras lesiones de la piel (8,10,22). Su papel como patógeno es difícil de establecer debido a la falta de información clínica, microbiológica y de criterios diagnósticos de los casos comunicados, agravado más si cabe cuando se aísla en cultivos polimicrobianos. La infección de la herida puede venir dada tras la aparición de traumatismos, quemaduras, pérdida iatrogénica de la continuidad de la piel por inserción de catéteres (8,29,53,55). Se ha descrito un aumento de las patologías oculares, conjuntivitis, queratitis, escleritis, dacriocistitis y celulitis preseptal (8,56). El aislamiento del microorganismo en los productos para el cuidado de las lentes, ha permitido considerar una posible sinergia con *Acanthamoeba spp.*, como punto de inflexión de la patogénesis amebiana. Se han documentado casos de aislamiento en los sistemas de aspiración de fluidos empleados en las intervenciones de cataratas (57).

#### **1.1.9 Métodos de tipificación en el estudio de *S. maltophilia***

Los estudios de tipificación en *S. maltophilia* han permitido la identificación de las fuentes ambientales o endógenas y la transmisión de cepas entre pacientes, que adicionalmente han facilitado la distinción entre la adquisición de nuevas cepas y la aparición de variantes más resistentes posteriores al tratamiento antibiótico. Las técnicas fenotípicas con finalidades epidemiológicas, perfil bioquímico y de sensibilidad a antimicrobianos, han resultado ser poco efectivas, dado el metabolismo relativamente inerte y la homogeneidad en el patrón de resistencia presentado por el microorganismo. La detección de los antígenos somáticos mediante aglutinación no aporta mayores ventajas dada la alta frecuencia de aparición de tres serotipos específicos respecto a los 31 serotipos totales definidos (58). La espectrofotometría de pirolysis de masas ha sido utilizada en la investigación de brotes nosocomiales (38) pero su alto coste y complejidad de realización lo descartan en la investigación epidemiológica. Las técnicas

genotípicas basadas en el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) o en la amplificación de regiones cromosómicas (PCR), permiten una mayor discriminación.

La restricción del ADN con endonucleasas, con mayor o menor frecuencia de corte, permite comparar diferentes perfiles de bandas o RFLPs característicos para cada cepa. Con enzimas de corte frecuente se producen numerosos fragmentos de baja resolución que más tarde separados mediante electroforesis convencional (REA, análisis con endonucleasas de restricción) aportan una difícil interpretación. A pesar de ello empleando enzimas del tipo BamH1 y BclI, se han podido detectar infecciones cruzadas entre pacientes y episodios independientes (59). La ribotipificación o hibridación de ácidos nucleicos ofrece un mayor poder discriminatorio que el REA. Aplicando la ribotipificación a *S. maltophilia* se van a generar un gran número de patrones de bandas o *ribotipos*, estables y reproducibles, que permiten una fácil diferenciación entre cepas. El nivel de discriminación obtenido dependerá del número de operones ribosomales presentes, y de la endonucleasa de corte (44,59-61) Cuando se procede a combinar los ribotipos obtenidos tras restricción con dos enzimas, la capacidad de discriminación se incrementa. Esta técnica ha sido sustituida por la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) de menor complejidad en su realización. El cambio periódico de la dirección de migración de las moléculas de ADN, previamente digerido con endonucleasas de baja frecuencia de corte, permite que fragmentos de ADN de megabases sean separados con efectividad en base a su tamaño. Produce patrones compuestos de 5-20 fragmentos bien resueltos con un peso molecular de 10-800Kbp. La principal desventaja es su alto coste y el tiempo de realización de la técnica. Hasta el momento el PFGE se considera la técnica más adecuada para la diferenciación de las cepas de *S. maltophilia* con una gran capacidad de discriminación y buena reproducibilidad en el estudio de brotes nosocomiales (23,25,26,62). Las enzimas de corte frecuentemente utilizadas, son fundamentalmente, DraI (62), SpeI (24) utilizadas en la detección de cepas epidémicas hospitalarias y XbaI en la estabilidad de un mismo pulsotipo durante 15 meses en un paciente con fibrosis quística (61)

Las técnicas genotípicas de PCR constituyen un método complementario o alternativo al PFGE, y aunque presentan menor reproductividad y discriminación, la rapidez, simplicidad y el bajo coste, suponen una importante ventaja. Las diferentes variedades, AP-PCR (arbitrarily-primed PCR) (26), RAPD (randomly-amplified polymorphic DNA PCR), y ERIC-PCR (entero bacterial repetitive intergenic consensus PCR) han sido utilizadas con éxito con objetivos epidemiológicos y taxonómicos en aislamientos clínicos y ambientales (25,63) con un rendimiento, especialmente RAPD PCR, próximo al PFGE (25).

#### **1.1.10 Mecanismos de resistencia**

*S. maltophilia* se caracteriza por presentar un perfil de sensibilidad muy homogéneo. La presencia de múltiples mecanismos de resistencia en esta especie le confiere resistencia natural a numerosos antimicrobianos de clases diferentes que junto con la resistencia adquirida por algunas cepas debido a la presión selectiva de los antimicrobianos, le aporta una ventaja

ecológica sobre otros posibles patógenos en el medio hospitalario. La resistencia a múltiples antimicrobianos, como en otras bacterias gramnegativas, se atribuye a la permeabilidad limitada de la membrana externa (64), a la expresión de sistemas de expulsión activa (65-67) y a la producción específica de enzimas hidrolíticas y, o, inactivantes (8).

El origen de la resistencia intrínseca de *S. maltophilia* está estrechamente relacionado con el hábitat natural desde donde se supone ocurre la diseminación del microorganismo. *S. maltophilia* coloniza de manera natural el suelo, agua y rizosfera vegetal, un microambiente rico en nutrientes y sustancias antimicrobianas producidas por las especies que comparten el nicho. La adaptación al microambiente implica la expresión de mecanismos defensivos frente a los antimicrobianos presentes en el micronicho incluidos los que produce la propia bacteria (68)

#### **1.1.10.1 Sistemas de expulsión activa**

La caracterización de los mecanismos de expulsión activa en *S. maltophilia* comenzó con la identificación de una proteína denominada SmeM (de Sme-*Stenotrophomonas multidrug efflux*), homóloga a los componentes de la membrana externa de diversos sistemas de expulsión activa habituales en otras bacterias gramnegativas, que era sobreexpresada en mutantes resistentes obtenidos *in vitro* y en aislados clínicos multirresistentes de *S. maltophilia* (69). Estos mutantes presentaron incrementos sustanciales en los niveles de resistencia a múltiples antimicrobianos. Dependiendo del agente inductor los mutantes *in vitro* obtenidos presentaban un perfil de resistencia incrementada diferente (69,70).

Los sistemas de expulsión encontrados en bacterias gramnegativas están constituidos por tres componentes, que en conjunto, funcionarían eliminando sustratos al medio exterior a través de ambas membranas bacterianas (71,72):

Un transportador de membrana citoplasmática, perteneciente a la familia de transportadores secundarios, RND, *resistance-nodulation-cell division*, energéticamente dependiente del potencial de membrana para la extrusión de sustratos.

Una proteína periplásmica asociada a la membrana citoplasmática, perteneciente a la familia de proteínas transportadoras MFP-*membrane fusion protein*. Se trata de una proteína de fusión que uniría ambas membranas bacterianas creando un canal de expulsión para los sustratos. Los análisis filogenéticos, indican que las MFP se agrupan en función de su especificidad, y que por tanto juegan un papel determinante en la especificidad de los sustratos que serán eliminados por el sistema.

Una proteína de membrana externa, OMF<sub>s</sub>-*outer membrane factors*. Estas proteínas no se agrupan de acuerdo al tipo de sustrato capaz de expulsar o de los transportadores con los que funciona, lo que garantiza que un determinado factor de membrana pueda funcionar con sistemas diferentes, como ocurre con la OMF OprM en los sistemas de *P. aeruginosa*, MexAB-OprM y MexXY-OprM.

Hasta la fecha han sido postulados ocho sistemas de expulsión pertenecientes a la familia RND, SmeABC, SmeDEF, SmeGH, SmeIJK, SmeMN, SmeOP-TolCsm, SmeVWX, and SmeYZ en el

genoma de *S. maltophilia* (73), de los cuales SmeABC, SmeDEF, SmeIJK, SmeOP-TolCsm, SmeVWX, and SmeYZ han sido completamente caracterizados (65,67,74-77). El primer sistema de expulsión caracterizado en *S. maltophilia*, denominado SmeDEF (65), presenta elevadas similitudes con los componentes de otros sistemas de expulsión previamente descritos en *E. coli* o *P. aeruginosa*. El sistema SmeDEF estaría implicado tanto en la resistencia intrínseca como adquirida a diversos antimicrobianos en *S. maltophilia* (66), y su presencia en aislados clínicos es detectada con relativa frecuencia (78). La hiperexpresión del sistema SmeDEF es consecuencia de una mutación puntual en el gen *SmeT* situado en una región próxima al primer gen del sistema SmeDEF, que regularía negativamente su expresión (79). Su desrepresión originaría la hiperexpresión del sistema SmeDEF y la resistencia a quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos y cotrimoxazol, sin al parecer, efecto aparente sobre aminoglucósidos y betalactámicos (66,78,80). Estas últimas clases de antimicrobianos serían sin embargo, también, buenos sustratos para el sistema SmeABC caracterizado posteriormente, y que al parecer solo estaría relacionado con la resistencia adquirida del microorganismo (67). Aunque el sistema SmeABC se detecta en cepas MDR, el fenotipo de resistencia característico es debido únicamente a la sobreexpresión del componente de membrana externa, SmeC, proteína con un peso molecular similar a SmeF, y con la que conserva un porcentaje elevado de regiones de aminoácidos.

El sistema SmeABC como tal no estaría directamente implicado en la resistencia a antimicrobianos y de hecho los sustratos que es capaz de expulsar son desconocidos hasta la fecha aunque se sugiere que podría funcionar del mismo modo que su homólogo expresado *Agrobacterium tumefaciens*, AmeABC y relacionado con la extrusión de intermediarios de la biosíntesis de purinas (67,81). En consecuencia es necesaria la sobreexpresión de SmeC para observar un aumento de la resistencia y de hecho esto ocurre en aquellos aislados que hiperexpresan SmeABC (67). La regulación del operón *SmeABC* se facilita a través de un sistema de dos componentes próxima al gen *SmeA*, gen *SmeS* con actividad sensor kinasa y *SmeR* activador transcripcional, en situaciones de estrés. *SmeR* regularía positivamente tanto su propio operón, *SmeSR*, como la expresión del sistema SmeABC. Hoy día no se conoce cuál es la mutación que precede a la hiperexpresión de SmeABC. Del mismo modo se ha demostrado que la inactivación de *SmeR* en cepas que hiperexpresan SmeABC, tendría un efecto intermedio en la resistencia no llegando a restarurar completamente los niveles de sensibilidad de las cepas salvajes que no hiperexpresan SmeABC (67). Aunque la delección de *SmeR* afecta negativamente a la expresión de SmeC, esta todavía es posible, sugiriendo que el gen *SmeC* podría poseer su propio promotor de expresión. Que SmeC, pero no SmeAB, contribuya a la resistencia a los antimicrobianos, y que pueda ser expresado de forma independiente a estos genes, confirma que SmeC pueda funcionar como parte de un sistema de expulsión adicional, aún desconocido, que acomodaría diversos antimicrobianos, tal y como ocurre con el componente externo oprM del sistema de *P. aeruginosa* MexAB-oprM. Se ha sugerido la regulación conjunta de los genes SmeC y de los genes implicados en la producción de la

betalactamasa L2, dado que la sobreexpresión de *SmeABC* (SmeC) aumenta la resistencia a los betalactámicos (67).

SmeIJK y SmeYZ son expresados constitutivamente y contribuyen junto con SmeDEF a la resistencia intrínseca a múltiples antimicrobianos. SmeYZ contribuye en la resistencia a aminoglucósidos y cotrimoxazol (82). La sobreexpresión de la bomba SmeVWX contribuye en la resistencia adquirida a cloranfenicol, quinolonas y tetraciclinas (76) en los mutantes que no sobreexpresan SmeDEF (83). SmeOp-TolCsm tendría un ligero papel en la resistencia ácido nalidíxico, doxiciclina, aminoglucósidos, macrólidos, betalactámicos y cotrimoxazol (84)

#### **1.1.10.2 Producción de betalactamasas**

El fenotipo de multirresistencia a betalactámicos se atribuye a la producción heterogénea de dos tipos de betalactamasas inducibles, L1 y L2 (85-87). La expresión de ambas betalactamasas es intrínseca e inducible. Se localizan en un fragmento de tipo plasmídico de gran tamaño que puede considerarse como parte de un cromosoma fragmentado (88).

L1 es una metalo-enzima de amplio espectro, de 3ª clase, zinc-dependiente, capaz de hidrolizar a todos los betalactámicos, incluidas penicilina, cefalosporinas, carbapenemas, excepto monobactamas. Es sensible a la acción de agentes quelantes como el EDTA, pero no a la acción de los inhibidores de betalactamasas, presentando un contenido en G+C del 68,4% y una masa molecular aproximada de 29 kDa, con un pI de 6.5 (8). L2 es una cefalosporinasa que presenta serina en su centro activo, con una resistencia de alto nivel a penicilinas y cefalosporinas, no hidrolizando apenas (0,004% respecto a la cefaloridina) a los carbapenemas, sensible a la acción de inhibidores de betalactamasas, especialmente a la del ácido clavulánico es resistente a la acción del EDTA (100  $\mu$ M). Constituida por una proteína con un contenido en G+C del 71,6% y una masa molecular aproximada de 31,5 kDa, presenta un pI de 8.4. Debido a su gran capacidad para hidrolizar la cefotaxima, fue clasificada en el grupo funcional 2be (8).

Existe una gran heterogeneidad genética en la producción de betalactamasas. Los diferentes valores de pI entre las distintas L1 y L2 de las diferentes cepas, se traducen en variaciones en las secuencias aminoacídicas de estas enzimas, aunque por el momento existe poca información sobre la asociación de determinados valores de pI y la presencia de cambios en las secuencias (8). Esta diversidad, presente en una misma especie, en la producción de L1 es un hecho excepcional, diferenciándose actualmente cinco isomorfos enzimáticos activos codificadas como L1a (89), 1b (90), y L1c, L1d, y L1e (88) con unos valores de divergencia en la secuencia de aminoácidos del 21, 11, 8 y 19%, con respecto a la primera descrita, L1a, respectivamente. Estos alelos de la L1 comparten semejante actividad hidrolítica sobre el imipenem, a excepción de la L1e cuya hidrólisis se halla disminuida de forma importante ( $K_{mL1a} = 47 \mu$ M,  $K_{mL1e} = 76 \mu$ M) como consecuencia de sustituciones aminoacídicas en zonas próximas a la unión con el sustrato que afectan su anclaje y en zonas de unión con el  $Zn^{2+}$  que afecta a la geometría de las histidinas, y por tanto la coordinación de los iones  $Zn^{2+}$  y de las moléculas de agua responsables del ataque nucleofílico al anillo del betalactámico.

Esta variación alélica también se pone de manifiesto con la betalactamasa L2, diferenciándose en 4 alelos: L2a, L2b, L2c y L2d, presentando unos coeficientes de divergencia de la secuencia proteica del 7, 5, y 32% respecto a la L2a. Esta variación alélica de los genes codificantes de betalactamasas puede reflejar una evolución acelerada implicándose procesos de transferencia génica horizontal.

Ambas enzimas se inducen por distintas vías, posiblemente divergentes. El control de la L1 se establece por un regulón "heat shock" adaptado, mientras que el control de la L2 se realizaría por el regulador clásico *ampR* (91).

Del mismo modo Avison y cols. (92), confirman la presencia de una betalactamasa TEM- 2, con un pI de 5.6 mediada por gen *bla*<sub>TEM</sub> localizado en un transposón, con elevada homología con Tn1 y Tn2, transferible a través de un plásmido conjugativo a una cepa de *E. coli*, sugiriendo el posible papel de *S. maltophilia* como reservorio para determinantes móviles de resistencia, intercambiando material genético con otras bacterias.

#### **1.1.10.3 Mecanismos de resistencia asociados a aminoglucósidos**

Durante años la resistencia a los aminoglucósidos en *S. maltophilia*, ha sido atribuida a la baja permeabilidad de la membrana externa (unido a la presencia de mecanismos de expulsión), que sería más acusada a bajas temperaturas de incubación, por lo menos *in vitro* (93) . Sin embargo esta percepción cambió radicalmente con la identificación de la 6'-N-acetiltransferasa de tipo I, aminoglicosidasa de 16 kDa codificada por el gen cromosómico *aac* (6')-Iz, presente en todas las cepas estudiadas (94). La enzima confiere resistencia de alto nivel a tobramicina, amikacina, netilmicina y en menor grado a gentamicina (95).

#### **1.1.10.4 Alteraciones en las topoisomerasas**

Los principales mecanismos de resistencia a quinolonas en una gran variedad de organismos (96) se deben a mutaciones específicas localizadas en las regiones determinantes de la resistencia a quinolonas (QRDR) de las subunidades constituyentes de la topoisomerasa II (GyrA, GyrB) y IV (ParC, ParE). Sin embargo la contribución en la resistencia a quinolonas en *S. maltophilia* es poco significativa (97-99). Al caracterizar el QRDR de *S. maltophilia* únicamente ha sido confirmado un elevado predominio de sustituciones en *parE* y en menor número en *gyrA* en aislamientos clínicos sensibles y resistentes a ciprofloxacino, que sin embargo no se asocian con un incremento en la resistencia a ciprofloxacino. Las mutaciones clásicas frecuentemente observadas en *gyrA* en otros organismos relacionados, posiciones 83 y 87, no han podido ser detectados en *S. maltophilia*, por lo que se descarta el posible papel de *gyrA* como diana primaria implicada en la resistencia a quinolonas (97,99). Del mismo modo estos autores detectaron un solo aislado que presentó mutaciones en *parC*. Sin embargo el cambio aminoacídico 80 (Ser-80→Arg) observado, diferente a los presentes en *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (100) y unido a que la mutación detectada en *gyrA* para este aislado resistente a ciprofloxacino, que necesariamente precede a la de *parC*, fue similar a otras detectadas en



cepas sensibles, impide poder extraer conclusiones apropiadas sobre el papel de *parC* en la resistencia a quinolonas del microorganismo (97).

#### **1.1.10.5 Otros mecanismos de resistencia de relevancia clínica**

*S. maltophilia* puede adquirir resistencia a través de integrones, transposones y plásmidos. Se ha demostrado que los integrones de clase 1 contribuyen en la resistencia a cotrimoxazol a través del gen *su1* que se transporta como parte del extremo 3' terminal del integrón. Los integrones de clase 1 han sido caracterizados en cepas aisladas en Argentina (101), Estados Unidos, Europa, Australia (102) y Taiwan (103) sugiriendo la extensa diseminación en *S. maltophilia*. Un estudio posterior demostró que los genes *su2* contribuyen también sustancialmente en la resistencia a cotrimoxazol en esta especie (102). En la mayoría de los casos *su2* es transportado en plásmidos de tamaño variable (7,3 kb, 120 kb) (102,104), aunque también se ha encontrado insertado en el cromosoma bacteriano. *Su2* está asociado a elementos de regiones comunes de las secuencias de inserción (ISCR) (102). Aproximadamente el 94% de las cepas resistentes a cotrimoxazol son portadoras de integrones clase 1 (104). En un 80% de las cepas resistentes se detecta el gen *su1*, en un 40% de las cepas resistentes se detecta *su2* y en un 20% de las cepas se detectan tanto *su1* como *su2* (104). La detección de *su1* pero no la del integrón o la del integrón pero no la de *su1* no se encontró asociada con resistencia a cotrimoxazol (104). Sin embargo todas las cepas portadoras de *su2* fueron resistentes a cotrimoxazol.

Los genes cassette *dhfrA*, localizados en los integrones de clase 1 codifican una enzima la dihidrofolato reductasa que produce un alto nivel de resistencia a cotrimoxazol (104).

El incremento de la prevalencia de integrones clase 1 en *S. maltophilia* supondría un serio revés para la terapia de las infecciones por *S. maltophilia*. Se sugiere extremar la vigilancia epidemiológica y no descartar la posibilidad de transferencia de esta forma de resistencia a cepas sensibles en pacientes que se encuentran bajo tratamiento con cotrimoxazol (101,104).

Más recientemente se ha descrito que *Stenotrophomonas maltophilia* contiene genes *qnr* (*Smqnr*) de codificación cromosómica que confieren un bajo nivel de resistencia a quinolonas (105). La sobreexpresión de *Smqnr* incrementa la resistencia a quinolonas lo que sugiere que además de tener un cierto papel en la resistencia intrínseca también está involucrado en la resistencia adquirida de *S. maltophilia* (106).

#### **1.1.11 Tratamiento de *S. maltophilia***

El tratamiento de las infecciones causadas por *S. maltophilia* es complicado y controvertido debido a que los mecanismos de resistencia presentes en esta especie confieren resistencia intrínseca a la mayoría de agentes terapéuticos disponibles y a la rápida aparición de resistencias bajo terapia antimicrobiana en cepas inicialmente sensibles al tratamiento. Contribuye notablemente la pobre estandarización de las pruebas de sensibilidad y de los criterios interpretativos de los resultados obtenidos y la dificultad para transferir los hallazgos

obtenidos *in vitro* a la práctica clínica. Este último aspecto se atribuye principalmente a falta de ensayos clínicos aleatorizados que comparen la eficacia de diferentes antimicrobianos, que cuando existe se recoge en series muy limitadas de casos.

#### **1.1.11.1 Opciones terapéuticas**

##### **1.1.11.1.1 Trimetoprim-sulfametoxazol (Cotrimoxazol)**

La sensibilidad a cotrimoxazol es superior al 90% (107-115). A diferencia del resto de clases de antimicrobianos *S. maltophilia* no dispone de mecanismos que confieran resistencia intrínseca frente a cotrimoxazol (8). Berg y cols, demostraron que esta ausencia de mecanismos de resistencia intrínseca estaba estrechamente ligada al origen natural del microorganismo (68). Compararon la sensibilidad de cepas con un origen clínico y cepas aisladas en el hábitat natural del microorganismo, principalmente suelo y rizosfera vegetal observando que la resistencia en ambos grupos era visiblemente elevada para penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos o quinolonas pero no para cotrimoxazol que demostró una excelente actividad (68).

Aun así en series aisladas se han registrado resistencias superiores al 30%, alertando de un posible aumento de la resistencia a cotrimoxazol en esta especie (44,103,104,116). Un reciente estudio constata esta tendencia en el sudeste asiático reflejando un incremento de la resistencia a cotrimoxazol del 15% al 31% en periodo de análisis de 10 años (116). Este incremento de la resistencia a cotrimoxazol está estrechamente relacionado con la rápida diseminación entre cepas de los elementos móviles que portan los determinantes de resistencia a cotrimoxazol (102), favorecida por el uso extensivo del antimicrobiano en el medio hospitalario (55). Vartivarian y cols, sugirieron que las políticas de uso de antimicrobianos modifican el patrón global de sensibilidad a los antimicrobianos en *S. maltophilia* y en particular afecta al nivel de resistencia a cotrimoxazol. Demostraron que la sustitución progresiva de cotrimoxazol por quinolonas en la profilaxis de pacientes con factores de riesgo, estuvo asociado a un paulatino descenso de la resistencia a cotrimoxazol y a un aumento de la resistencia a ciprofloxacino (55). Un estudio similar realizado en España constata esta variación asociada a la reducción del número de dosis de cotrimoxazol (117). La resistencia a cotrimoxazol disminuyó desde el 19% al 5% pero la de ciprofloxacino aumentó significativamente desde el 54% hasta el 69% y la de norfloxacino desde el 69% hasta el 81% (117).

La eficacia de cotrimoxazol se limita a un anecdótico número de casos clínicos (15,22,29,55). Muder y cols, en un estudio prospectivo de 91 casos de bacteriemia de pacientes seriamente inmunocomprometidos demostraron una mortalidad cruda del 24% entre los pacientes tratados con cotrimoxazol en monoterapia frente a un 34% entre los pacientes tratados con otros antimicrobianos. Los autores sugieren el uso de cotrimoxazol de forma empírica hasta conocer los resultados de sensibilidad empleando dosis intravenosas de 10 mg/Kg en pacientes con una función renal normal. La incorporación de otro antimicrobiano en combinación se debería

considerar teniendo en cuenta la incidencia de la resistencia a cotrimoxazol (15). Sin embargo otros estudios refieren cultivos positivos de *S. maltophilia* en pacientes de riesgo bajo profilaxis con cotrimoxazol (29,55) y la persistencia del microorganismo en tratamientos prolongados con cotrimoxazol sin cambios aparentes en la sensibilidad de los aislados (118). Este comportamiento clínico se relaciona con el efecto bacteriostático que cotrimoxazol exhibe frente a la mayoría de las cepas (55,119). Zelenitsky y cols demostraron este efecto frente a cepas sensibles utilizando dosis intravenosas de cotrimoxazol de entre 5 y 25 mg/Kg cada 12 horas en un modelo farmacodinámico *in vitro*. Dosis de 5 mg/Kg fueron completamente ineficaces y las dosis superiores no mejoraron significativamente la actividad (120).

#### **1.1.11.1.2 Ticarcilina-ácido clavulánico**

Las tasas de resistencias de penicilinas como amoxicilina, ampicilina, piperacilina, o ticarcilina o aztreonam son invariablemente altas aunque la combinación con los inhibidores de betalactamasas, especialmente el ácido clavulánico mejora sensiblemente la actividad (33,107,121,122). De las múltiples combinaciones entre penicilinas e inhibidores de betalactamasas estudiadas ninguna ha demostrado una actividad similar a ticarcilina-ácido clavulánico. Esta actividad se relacionaría con la capacidad de la enzima L1 para hidrolizar diferentes penicilinas, muy inferior en el caso de ticarcilina (123). La sensibilidad de la combinación es del 70% (123-126) aunque algunos estudios reportan resistencias de entre el 40-55% (109,127,128). La selección de resistencias es frecuente a dosis terapéuticas *in vitro* (118,126) y al igual que ocurre con otros antimicrobianos en esta especie también probablemente *in vivo* (118). Pankuch y cols demostraron que concentraciones de 16/2 µg/ml reducen en 2-log (UFC/ml) las poblaciones de *S. maltophilia* tras 6 horas de incubación pero que tras 24h de incubación esta actividad solo puede ser mantenida a concentraciones de 128 µg/ml (126). Garrison y cols, en un sistema farmacodinámico *in vitro* fuertes recrecimientos bacterianos tras una fase inicial de supresión del crecimiento bacteriano empleando dosis de 3 g/100 mg cada 6h de ticarcilina-ácido clavulánico (118), por lo que sugirieron la necesidad de estudios controlados para demostrar la eficacia real de esta combinación.

En un modelo animal de neumonía ticarcilina-ácido clavulánico y cotrimoxazol fueron igual de efectivas (129).

#### **1.1.11.1.3 Carbapenemas, cefalosporinas, y aztreonam**

*S. maltophilia* es intrínsecamente resistente a los carbapenemas. Prácticamente todas las cepas son resistentes a meropenem o imipenem (130). Entre las cefalosporinas solo ceftazidima, cefaperazona y cefepima muestran cierta actividad *in vitro*, que no obstante es, según algunos estudios, indeseablemente baja con resistencias del 50-70% (44,107,110,124,131,132). Las combinaciones con inhibidores, especialmente ácido clavulánico y sulbactam se mencionan de forma anecdótica pero sin una clara demostración *in vitro* de su efectividad (123,133). Un estudio describe que la combinación cefepima-ácido clavulánico (2 µg/ml) sería sinérgica en un

mayor número de aislados que la de ticarcilina-ácido clavulánico y presentaría un porcentaje de resistencias inferior (121). Al igual que ocurre con ticarcilina, cefepima sería un sustrato afectado de forma muy limitada por la hidrólisis de la enzima L1 (123). Las combinaciones de aztreonam-ácido clavulánico y en particular las combinaciones de proporción 1:1 o 2:1, exhiben buena actividad frente a *S. maltophilia* y muy superior a la actividad del resto de combinaciones. Sin embargo la farmacocinética de ambas moléculas no es compatible en los términos que establece la asociación *in vitro* y difícilmente se mantendría el sinergismo en una supuesta aplicación clínica de la combinación (122,133).

#### 1.1.11.1.4 Fluorquinolonas

Las nuevas fluorquinolonas clinafloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, gatifloxacin, grepafloxacin y sitafloxacin muestran una actividad muy superior al de las primeras quinolonas (44,109,112,113,115,124,125,134). Muchos estudios destacan la escasa actividad de ciprofloxacino en *S. maltophilia* (33,110,112,124,131,135). La concentración mínima inhibitoria para el 90% de la población (CMI<sub>90</sub>) para ciprofloxacino se ha incrementado notablemente en los últimos años probablemente por la pobre relación entre la concentración máxima (C<sub>max</sub>) de dosis habituales de ciprofloxacino y la CMI<sub>90</sub> del microorganismo (112). Comparativamente la actividad de ciprofloxacino es muy inferior a la de las fluorquinolonas. Un estudio *in vitro* con 124 cepas clínicas reveló un 85,5% de sensibilidad para levofloxacin frente al 59% de levofloxacin (136). Valdezate y cols, demostraron una sensibilidad superior al 95% para las nuevas fluorquinolonas, en línea con los resultados obtenidos en otros trabajos (112,113,115,126). La resistencia a gatifloxacin es baja y oscila entre el 2 y 15% según el área geográfica (125,127). Clinafloxacin es con diferencia la fluorquinolona más activa en esta especie (112,126).

La sensibilidad no se ve afectada de manera significativa cuando los estudios se realizan con aislados genéticamente diferentes, lo que sugiere que las cepas repetidas procedentes de transmisiones cruzadas o de un mismo paciente bajo terapia antimicrobiana que potencialmente pueden acumular determinantes de resistencia, no afectan a la sensibilidad de las nuevas fluorquinolonas (113,135). Sin embargo la resistencia si se incrementa significativamente para ciprofloxacino (135).

Empleando estudios dinámicos de la actividad se ha demostrado el efecto bactericida de gatifloxacin, moxifloxacin y levofloxacin frente a *S. maltophilia*. Cohn y Waites (137) demostraron mediante curvas de muerte que gatifloxacin es bactericida frente a cepas teóricamente consideradas sensibles (CMI de 0,125 a 2 µg/ml) y que concentraciones superiores a la CMI para estas cepas previenen la aparición de recrecimientos bacterianos (137). Giamarellos-Bourboulis y cols, demostraron el efecto bactericida de moxifloxacin frente a cepas resistentes a cotrimoxazol. Estimaron que cepas con una CMI de hasta 2 µg/ml podrían ser apropiadamente tratadas con moxifloxacin teniendo en cuenta las concentraciones alcanzadas en suero con dosis habituales, pero que cepas con una CMI superior podrían

fácilmente seleccionar mutantes resistentes. Una excepción serían las infecciones del tracto respiratorio donde la molécula se acumula satisfactoriamente (134). Ba y cols, confirmaron la superioridad *in vitro* de moxifloxacino frente a ciprofloxacino a dosis terapéuticas empleando un sistema farmacodinámico *in vitro* pero también la selección de mutantes resistentes incluso en cepas con una baja CMI a moxifloxacino (138). Bonfiglio y cols demostraron que 2 µg/ml de levofloxacino pero no 2 µg/ml de ofloxacino o 1 µg/ml de ciprofloxacino (concentraciones que definen los puntos de corte de sensibilidad microbiológica en *S. maltophilia* o especies relacionadas) fueron bactericidas frente a cepas muy sensibles a levofloxacino y evitaron los recrecimientos bacterianos (139). Sin embargo, *in vitro*, dosis convencionales seleccionan mutantes resistentes tras un aparente periodo de importante actividad antimicrobiana (118,140). Visalli y cols obtuvieron resultados similares con levofloxacino y trovafloxacino y sugirieron que la administración de las nuevas fluorquinolonas en monoterapia debería efectuarse con frecuencias más cortas (141).

El estudio de la actividad bactericida del suero de ciprofloxacino, ceftazidima y meropenem sugiere también la necesidad de un cambio de estrategia en la dosificación de los antimicrobianos que se muestren activos frente al microorganismo (142). Según este estudio dosis de 400 mg de ciprofloxacino y de 2 g de ceftazidima demuestran una actividad limitada frente a cepas sensibles de *S. maltophilia* pero estas son erradicadas cuando se emplean dosis máximas toleradas. Meropenem no mostró actividad con ninguna de las dosis analizadas (142). Con respecto a la eficacia clínica de las fluorquinolonas la información publicada es muy limitada (8,140,143). En una revisión de 113 casos la eficacia de cotrimoxazol (79%, 34 de 43 pacientes) y de las fluorquinolonas (92%, 12 de 13 pacientes), principalmente ciprofloxacino, fue comparable aunque el número de casos disponibles en ambas ramas de tratamiento fueron significativamente diferente (140). Recientemente se ha realizado un estudio retrospectivo que incluyó a 98 pacientes infectados con *S. maltophilia* tratados en monoterapia con cotrimoxazol o fluorquinolonas, mayoritariamente levofloxacino. Ambos tratamientos mostraron una eficacia similar con un 55% de éxito clínico en el grupo de las fluorquinolonas frente a un 61% en el grupo de cotrimoxazol. La mortalidad en ambos grupos fue similar (25% para las fluorquinolonas frente al 22% para cotrimoxazol) y la aparición de resistencias en cultivos repetidos del 30% para las fluorquinolonas y del 20% para cotrimoxazol (143).

Los resultados de eficacia clínica disponibles con las nuevas fluorquinolonas son poco concluyentes aunque la actividad *in vitro* permite especular con un papel más determinante en la terapéutica del microorganismo. Sin embargo hasta que no se conozca su verdadera efectividad en estudios *in vivo* o *in vitro* la aplicación clínica no pasará de anecdótica.

#### **1.1.11.1.5 Aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclinas y polimixinas**

Los aminoglucósidos muestran una pobre actividad frente a las cepas de *S. maltophilia* debido a la producción constitutiva de enzimas modificadores de la actividad. Los estudios *in vitro*

demuestran niveles de resistencia invariablemente altos a gentamicina, tobramicina y amikacina (107,113,125,135).

Cloranfenicol es más activo aunque la resistencia varía según el estudio entre el 11 y 81% (109,135) La experiencia clínica con cloranfenicol es extremadamente limitada (132,144).

Entre las tetraciclinas minociclina muestra elevada actividad *in vitro* con una sensibilidad superior al 80% (125,128,131,135,145), aunque su derivado semisintético, la tigeciclina (9-*t*-butilglicilamido-minociclina) se muestra también muy potente inhibiendo según la región estudiada entre el 89,3 y el 98,3% de las cepas a concentraciones de  $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$  (punto de corte recomendado por las autoridades regulatorias norteamericanas (FDA) (146). Doxiciclina también ha demostrado en algún estudio una excelente actividad *in vitro* (135).

Un reciente estudio examinó la eficacia de cotrimoxazol y tigeciclina en infecciones nosocomiales por *S. maltophilia* en un periodo de tres años señalando que no existieron diferencias significativas en la mortalidad (30% vs. 21% respectivamente) o respuesta clínica entre ambos tratamientos (69,2% vs. 68,4% respectivamente) (147) Sin embargo a dosis convencionales y de acuerdo a la sensibilidad local del microorganismo Wei y cols. sugieren empleando simulaciones de Montecarlo una respuesta clínica adecuada para minociclina pero no para tigeciclina que debería administrarse en combinación con otros antimicrobianos para garantizar su eficacia (148).

Las polimixinas han adquirido una gran importancia en el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias gramnegativas no fermentadoras. La sensibilidad según algunos estudios se acerca al 70-75% (109,149). No obstante la actividad de colistina y polimixina B es muy vulnerable al medio de cultivo o de la temperatura y con frecuencia se detectan organismos falsamente sensibles a ambos antimicrobianos.

#### **1.1.11.1.6 Combinaciones de antimicrobianos**

La actividad de los antimicrobianos en combinación ha sido ampliamente estudiada *in vitro* en *S. maltophilia* (119,141,150-153). Muchas de las combinaciones analizadas son sinérgicas frente al microorganismo aunque solo un número limitado muestra efectos sinérgicos a concentraciones terapéuticas de ambas moléculas. Algunas de estas han sido demostradas empleando diferentes técnicas de estudio lo que refuerza el potencial para emplearse en clínica (tabla 1). La mayoría de las combinaciones activas incluye una fluorquinolona. Trovafloxacin, levofloxacin y ciprofloxacino han demostrado un efecto sinérgico o aditivo al combinarlas con cefalosporinas de tercera y cuarta generación (141,150). Gatifloxacino en combinación con ceftazidima, ticarcilina-clavulánico o aztreonam pero no con minociclina han demostrado ser muy activas (151). La combinación de moxifloxacino con ticarcilina-ácido clavulánico ha sido propuesta como una alternativa prometedora al tratamiento de *S. maltophilia* (152).

La combinación de cotrimoxazol con ciprofloxacino o ticarcilina-ácido clavulánico o una cefalosporina de tercera generación exhiben sinergismo *in vitro* tanto en cepas inicialmente sensibles como resistentes a cotrimoxazol (119). En base a los datos *in vitro* también se ha

sugerido la combinación de cotrimoxazol con minociclina y ticarcilina clavulánico (55) o la combinación de cotrimoxazol con rifampicina y carbenicilina que *in vitro* se ha mostrado sinérgica (8).

En un estudio se ha descrito la utilidad de rifampicina y polimixina B en combinación con cotrimoxazol, meropenem, cefepima, piperacilina o ciprofloxacino frente a cepas multirresistentes aunque a concentraciones cuestionables de ambas moléculas (154).

**Tabla 1.** Combinaciones con efecto sinérgico frente a *S. maltophilia*, confirmadas mediante tablero de ajedrez y curva de muerte bacteriana

Sinergismo A/B	Concentración A <sup>a</sup>	% sinergismo <sup>b</sup>
Trovafloracino/cefepima	-	50
Trovafloracino-cefoperazona	0.004-0.5/-	90/70
Trovafloracino-ceftazidima	0.004-0.5	95
Trovafloracino-ceftiproma	0.004-0.5	95
Trovafloracino-gentamicina	0.004-0.5	65
Levofloxacin-cefoperazona	0.03-0.5	80
Levofloxacin-ceftazidima	0.03-0.5	90
Levofloxacin-ceftiproma	0.03-0.5	85
Levofloxacin-gentamicina	0.03-0.5	65
Ciprofloxacino-cefoperazona	0,5-2	80
Ciprofloxacino-ceftazidima	0,5-2/ 1	85/75
Ciprofloxacino-ceftiproma	0,5-2	75
Ciprofloxacino-gentamicina	0,5-2	75
TIC/CLAV-cotrimoxazol	32	100
TIC/CLAV-ciprofloxacino	32	75
Gentamicina-PIP/TAZ	4-16	83,3
Ciprofloxacino-PIP/TAZ	2-4	83,3
Gatifloxacino-ceftazidima	2	62,5
Gatifloxacino/TIC/CLAV	2	62,5
Gatifloxacino/aztreonam	2	50

<sup>a</sup> concentraciones del antimicrobiano A empleadas en combinación con B, <sup>b</sup>porcentaje de cepas sinérgicas en curvas de muerte bacteriana.

#### 1.1.11.2 Variabilidad de los resultados de sensibilidad dependiente del método y de las condiciones de las pruebas de sensibilidad

La composición del medio de cultivo (155) es especialmente determinante en las pruebas de sensibilidad con betalactámicos que muestran un aumento de la resistencia con la progresiva reducción de nutrientes en el medio de cultivo.

La concentración de iones divalentes o específicamente del Zn<sup>2+</sup> en el medio afecta a los resultados obtenidos para las carboxi y ureidopenicilinas e imipenem pero no meropenem. Esta diferencia entre los carbapenemas se atribuye a que la betalactamasa L1, necesita de su estructura multimérica para hidrolizar al imipenem, y solo la monomérica que requiere menos zinc para hidrolizar al meropenem (156,157).

La variabilidad en los resultados aumenta cuando indistintamente se comparan resultados obtenidos con los diferentes métodos que recomienda el CLSI para los estudios de sensibilidad (158), lo que suscita la necesidad de establecer un referente perfectamente estandarizado

(159). Esta necesidad afecta también a las condiciones de desarrollo del test con independencia del método empleado.

El método de difusión en disco ha sido considerado inapropiado y poco reproducible (110,126,160). Algunos autores señalan que se trata de un método tan fiable como el E-test o la dilución en agar para el estudio de la sensibilidad a quinolonas (161), aunque otros advierten de la existencia de un 12% de errores mayores y de un 58% de errores menores cuando se comparan ambas metodologías (160). Traub y cols, en un intento por corregir discrepancias entre los métodos de difusión y dilución en agar, propusieron la inclusión de nuevos criterios para la interpretación de los resultados obtenidos con la difusión en disco como el aumento sistemático de los halos de inhibición de la categoría de sensibilidad intermedia para aminoglucósidos, cefalosporinas, cloranfenicol, piperacilina- tazobactam y ticarcilina- ácido clavulánico (131).

Pankuch y cols. extienden más tarde esta controversia a otros métodos mostrando diferencias significativas en los resultados de sensibilidad obtenidos mediante la dilución en agar, la microdilución en caldo, el E-test y la difusión en disco. Demostraron que tanto la difusión en disco como el E-test necesitan ser modificados para correlacionarse eficazmente con los otros dos métodos, y que el único que ofrece resultados concordantes con los obtenidos mediante curvas de muerte bacteriana, por lo menos para ticarcilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam y ciprofloxacino, es la dilución en agar, método que recomiendan para la determinación de la CMI en esta especie (126). Otros autores (110), sin embargo, establecen una buena correlación (94%) entre la dilución en agar y el E-test, destacando que resulta un método fiable para betalactámicos, fluorquinolonas, cotrimoxazol o tobramicina debido a los escasos errores mayores que aparecen en su comparación.

Más recientemente, Carrol y cols demostraron que, mientras que el cotrimoxazol es el antimicrobiano más estable independientemente del método aplicado, difusión en disco, E-test, (altamente relacionados), microdilución, Vitek o MicroScan, el resto de antimicrobianos estudiados ofrecieron importantes inconsistencias entre los métodos de disco y E-test y los métodos que emplean caldo (128). Estos mismos autores confirman que las mayores discrepancias se obtienen cuando se incrementa el tiempo de incubación hasta las 48 horas. Estas discrepancias dependientes del tiempo de incubación fueron también mostradas por Pankuch y cols quienes además demostraron que la metodología que ofrecía menores variaciones entre las 24 y 48 horas de lectura, era la dilución en agar (126).

La independencia que muestra cotrimoxazol a la metodología empleada (110,128,131), fue puesta nuevamente de manifiesto por Wiles y cols (162). Estos autores empleando microdilución, E-test, dilución en agar y difusión en disco, confirmaron la buena correlación entre métodos y las escasas variaciones al incrementar el periodo de incubación. Las mayores discrepancias se obtuvieron con las cepas cuya sensibilidad se encontraba cercana al punto de corte establecido, recomendando para estas cepas su confirmación mediante otros métodos.



En un intento de estandarización de las pruebas de sensibilidad, Carrol y cols, sugirieron que el estudio de sensibilidad para los agentes bacteriostáticos como doxiciclina, minociclina o cotrimoxazol con un comportamiento independiente del método sea interpretado tras una incubación de 16-18h mientras que para los agentes bactericidas es preferible extender la incubación hasta las 48 horas (128). Estas recomendaciones se apoyaron en parte en la rápida aparición de resistencias a los antimicrobianos bactericidas *in vivo* e *in vitro* en *S. maltophilia* y a que la sensibilidad se mantiene sin cambios aparentes en tratamientos prolongados cuando se emplean antimicrobianos como el cotrimoxazol (118).

Las variaciones en los resultados con la temperatura de incubación es otro factor determinante que se debe considerar. En 1985, Wheat y cols describieron diferencias significativas en la sensibilidad de aminoglucósidos y polimixina B a temperaturas de 30°C y 37°C. Este efecto no se apreció en especies relacionadas o de *Enterobacteriaceae* (163). Wilcox y cols, relacionaron la variación dependiente de la temperatura en gentamicina con alteraciones en los perfiles de las OMP (164) pero algo más tarde, Rahmati-Bahram y cols., demostraron que el efecto se atribuye a cambios en la conformación de la membrana externa de la bacteria, concretamente en la estructura del lipopolisacárido (LPS), asociado a un mayor contenido en antígeno O y a una variación en el contenido de fosfatos del LPS, sitio de unión más importante para los aminoglucósidos (93,164,165). Con estos resultados se sugirió que la sensibilidad a aminoglucósidos debería de realizarse a 30°C debido a que en distintas infecciones donde está implicado el microorganismo, shock séptico, lesiones en la piel o cavidad peritoneal de pacientes de diálisis, podemos encontrarnos con estas bajas temperaturas (93,164).

Este efecto se ha demostrado además en colistina, tetraciclina o cefoperazona-sulbactam con cambios en al menos cuatro veces la CMI para el 10-50% de las cepas (167), de dos a cuatro en macrólidos (168) y de dos a dieciséis en ciprofloxacino y trovafloxacino entre ambas temperaturas (169). En curvas de muerte bacteriana moxifloxacino y levofloxacino reduce la carga bacteriana en 2-log UFC/ml menos a temperaturas 30°C (170).

Se ha identificado un efecto mínimo para los betalactámicos, cloranfenicol, minociclina o doxiciclina, rifampicina, fosfomicina y vancomicina, pero no para cotrimoxazol (168).

#### **1.1.11.3 Recomendaciones al tratamiento de las infecciones por *S. maltophilia***

En la actualidad no hay recomendaciones específicas para el manejo de los pacientes colonizados o infectados por *S. maltophilia*. No hay datos suficientes que sugieran el tratamiento de los pacientes colonizados por *S. maltophilia*. No obstante estaría recomendado si se considera que puede actuar como patógeno indirecto (35). Se ha demostrado que bajo terapia con betalactámicos *S. maltophilia* promueve el crecimiento de los patógenos sensibles al conferir protección por la producción de las betalactamasas L1 y L2 (35).

La evidencia de la mortalidad directamente atribuida a las infecciones por *S. maltophilia* sugiere sin embargo la necesidad de un tratamiento adecuado (34,171,172). Las recomendaciones para el tratamiento de las infecciones de *S. maltophilia* proceden de los resultados de sensibilidad y

de un limitado número de informes de casos y series de casos clínicos (172). No hay datos disponibles de ensayos clínicos que permitan valorar alternativas terapéuticas a las recomendadas en esta especie y los datos que proceden de la experiencia clínica deberían considerarse con cautela por los sesgos de publicación relacionados con la eficacia de los antimicrobianos, que como informes de casos que presentan un fracaso del tratamiento sería menos probable que se publicaran. Del mismo modo los resultados de sensibilidad deberían considerarse con escepticismo debido a que no son capaces de pronosticar la verdadera sensibilidad y en última instancia el efecto terapéutico (152,172).

Cotrimoxazol, debido a que >90% de las cepas son sensibles, es considerado tratamiento empírico de choque de las infecciones con una clínica compatible con *S. maltophilia* y como tratamiento dirigido en las infecciones con presencia confirmada del microorganismo tras el cultivo microbiológico (8,30). Se sugiere como tratamiento empírico en pacientes con factores de riesgo tipo, incluso en infecciones donde su uso no es rutinario. Hanes y cols, recomendaron su uso en las neumonías nosocomiales a pesar del comportamiento bacteriostático y de la reducida actividad frente a otras bacterias gramnegativas debido al pobre resultado clínico obtenido empleando tratamientos alternativos (30).

La superioridad de los antimicrobianos bactericidas frente a los bacteriostáticos en las infecciones bacterianas es un tema controvertido y pueden no asociarse a un mejor pronóstico clínico para la mayoría de las infecciones. Sin embargo en algunas infecciones se requiere una acción bactericida efectiva, como en las endocarditis, meningitis, osteomielitis e infecciones sistémicas, especialmente en pacientes inmunocomprometidos (173). Debido a este comportamiento bacteriostático otros autores sugieren su administración a dosis máximas toleradas en infecciones severas (55) lo que representa una sustancial limitación debido a la toxicidad de la sulfonamida (174) o en combinación con otros tratamientos (15,175). Mendoza y cols, sugieren el uso de combinaciones de antimicrobianos especialmente en las bacteriemias (176).

En caso de resistencia o alergia a cotrimoxazol la combinación ticarcilina-ácido clavulánico, ceftazidima o ciprofloxacino en monoterapia o en combinación con otros antimicrobianos podrían ser empleados como tratamientos alternativos (8,172). La respuesta clínica oscila entre el 66.7% y 85% pero los casos disponibles no permiten recomendar una terapia basada en la evidencia (172). La elección en estos casos de un tratamiento en monoterapia o en combinación es un aspecto controvertido. Diversos autores consideran la administración en combinación especialmente en el paciente neutropénico o inmunocomprometido, que representa a la mayoría de los pacientes en riesgo (119,132) debido a la posibilidad de aparición de resistencias durante el tratamiento con la monoterapia (15,55,118,128,177).

Ante la carencia de alternativas de probada efectividad la desensibilización de pacientes con hipersensibilidad al cotrimoxazol ha sugerida como una alternativa eficaz (178,179). Mendoza y cols, sugieren que las nuevas fluorquinolonas podrían ser indicadas para el tratamiento de *S. maltophilia* de acuerdo a los resultados procedentes de los estudios de sensibilidad (176).

El aumento de la resistencia a los tratamientos de elección (33) y la falta de alternativas con una significativa actividad frente al microorganismo conduce a una situación límite ante la que muchos pacientes reciben terapias no apropiadas significativamente asociadas con una respuesta clínica insuficiente (31,34). La prevención de la transmisión y la prudente aplicación de la antibioterapia, son las principales medidas para controlar las infecciones causadas por *S. maltophilia* (117).

#### **1.1.11.4 Estrategias alternativas al tratamiento convencional**

La búsqueda de nuevas moléculas no relacionadas estructuralmente con los antimicrobianos existentes es una alternativa prometedora. Los péptidos biactivos buforina II, Cecropina P1, Magainin II, muestran una excelente actividad in vitro, son rápidamente bactericidas y por su estructura evaden los mecanismos de resistencia intrínseca presentes en esta especie. En curvas de muerte bacteriana erradican a las poblaciones de *S. maltophilia* a concentraciones relativamente bajas en menos de 30 minutos (180). Demuestran efectos sinérgicos a concentraciones de entre 5 y 16 µg/ml en combinación con la piperacilina, ceftazidima, meropenem, claritromicina y polimixina E (180).

May y cols estudiaron la actividad de aceites esenciales derivados de la planta del té con muy buenos resultados. Los compuestos analizados fueron rápidamente bactericidas (181).

La expresión de sistemas de expulsión en bacterias gramnegativas confiere resistencia intrínseca y adquirida a muchas de las clases de antimicrobianos de uso frecuente en la terapéutica de las infecciones causadas por estos organismos. La caracterización de estos sistemas en especies de relevancia clínica ha fomentado el desarrollo de estrategias que intensifiquen la respuesta antimicrobiana en bacterias que los expresan. Un claro ejemplo lo encontramos en la síntesis dirigida de fluorquinolonas como moxifloxacino, gatifloxacino, clinafloxacino o trovafloxacino. Son moléculas con una estructura menos hidrófila que la de ciprofloxacino que escapan del efecto de los sistemas de expulsión más importantes de bacterias grampositivas, NorA o PmrA. Estas fluorquinolonas muestran un efecto comparativamente más reducido en bacterias gramnegativas (182) debido a la contribución de la membrana externa en la resistencia de las moléculas poco hidrofílicas. De esta forma la imposición estructural de los antibacterianos activos frente a organismos gramnegativos dificulta la obtención de agentes efectivos mediante síntesis dirigida.

Otra alternativa es combinar antimicrobianos activos que son sustratos de los sistemas de expulsión con moléculas que interfieran en el normal funcionamiento de las bombas, siempre que la actividad de los sustratos no esté afectada por mecanismos de resistencia intrínseca adicionales. Representa por lo tanto una estrategia apropiada para las quinolonas en las bacterias gramnegativas incluyendo cepas con resistencia adquirida por mutaciones puntuales en las topoisomerasas.

Reserpina es un inhibidor de diversos sistemas de transporte de bacterias grampositivas (182,183), y se ha empleado para estudiar sistemas de expulsión de bacterias gramnegativas

como *Bacteroides fragilis* (184,185) *A. baumannii* y *S. maltophilia* (186,187). Se trata de un agente tóxico sin aplicaciones terapéuticas.

La L-fenilalanina-L-arginina- $\beta$ -naftilamida, Phe-Arg- $\beta$  naftilamida, (identificada como MC-207,110 por Microcide Pharmaceuticals, ahora Essential Therapeutic Inc) es el primer inhibidor de amplio espectro de los sistemas de expulsión pertenecientes a la familia RND. Lomovkaya y cols, demostraron que Phe-Arg- $\beta$  naftilamida inhibe los sistemas MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprN de *P. aeruginosa* reduciendo en 8 veces la resistencia intrínseca a levofloxacino en cepas que expresan estos sistemas y en hasta 64 veces la resistencia intrínseca y adquirida en los mutantes resistentes que hiperexpresan alguno de los sistemas de expulsión referidos. Del mismo modo la frecuencia de selección de mutantes disminuye significativamente en presencia del inhibidor (188).

## 1.2 Farmacodinámica y farmacocinética-farmacodinámica de los antimicrobianos

### 1.2.1 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La farmacodinamia es un término usado para reflejar la relación entre la concentración de fármaco expuesta en suero, tejidos o fluidos corporales y el efecto farmacológico. Con los antimicrobianos refiere a la relación entre la concentración y el efecto antimicrobiano.

La CMI ha sido y es el parámetro principal en la cuantificación de la sensibilidad de los antimicrobianos. La CMI se obtiene empleado test relativamente simples que pueden ser realizados en cualquier laboratorio. La CMI es una medida del efecto neto en el crecimiento y la muerte microbiana inducida por el antimicrobiano durante el periodo de incubación, valorada a un tiempo y concentración fijos. Se basa en la inspección ocular y por lo tanto está asociada a error subjetivo importante. La CMI es un valor umbral monodimensional que descuida el error de medición, los cambios dinámicos en el crecimiento y en la sensibilidad durante el período de tiempo estudiado o la persistencia del efecto tras la exposición. Entre ellos el efecto postantibiótico, el efecto postantibiótico de las concentraciones sub-CMI y el efecto postantibiótico en presencia de leucocitos.

Aunque es una medida de referencia para establecer la potencia de los antimicrobianos no es un buen parámetro para caracterizar las relaciones farmacodinámicas de concentración-efecto.

### 1.2.2 Relación concentración-efecto de los antimicrobianos

La relación entre la concentración y el efecto de los antimicrobianos ha sido caracterizada a lo largo de estas últimas tres décadas. Entre los 70 y los 80 se aceptó clasificar a los antimicrobianos en dos grandes grupos de acuerdo a los diferentes patrones de actividad bactericida demostrados en los experimentos de curvas de muerte bacteriana *in vitro*. Las curvas de muerte bacteriana son ensayos estáticos que valoran la extensión y rapidez del efecto antibacteriano generalmente dentro de un plazo de 24 horas y en un medio sin renovación de nutrientes. El efecto clásicamente se resume en cuatro tipos característicos denominados, efecto estático o ausencia de cambios en el recuento de células de la población con el tiempo, efecto bacteriostático, o reducción leve de la población bacteriana (inferior a 3-log UFC/ml), efecto bactericida o reducción pronunciada de la población bacteriana (superior a 3-log UFC/ml) y un efecto de recrecimiento caracterizado por el aumento de la población bacteriana en presencia del antimicrobiano en cualquier momento de la exposición.

El primer patrón de actividad está caracterizado por una muerte bacteriana dependiente de la concentración para un amplio intervalo de concentraciones. Con este patrón al aumentar la concentración del antimicrobiano, la muerte bacteriana es más rápida y más extensa. Este es un comportamiento típico de aminoglucósidos, fluorquinolonas, cetólidos, metronidazol y anfotericina (189). El segundo patrón está caracterizado por una mínima actividad dependiente de la concentración. En este caso la actividad se satura superada una determinada concentración y concentraciones superiores no aumentan la extensión ni la rapidez de la muerte

bacteriana. Este patrón se conoce como patrón tiempo-dependiente ya que la extensión de la muerte depende primeramente del tiempo que el microorganismo está expuesto por encima de una determinada concentración de antimicrobiano, cuatro o cinco veces la CMI. Es típico de betalactámicos, algunos macrólidos, clindamicina, glicopéptidos, trimetoprim, linezolid o tetraciclinas (189,190). Por otro lado el estudio de la persistencia del efecto mediante curvas de muerte bacteriana, efecto post-antibiótico o efecto de las concentraciones sub-inhedoras han demostrado que el efecto persiste moderada o prolongadamente en todos los antimicrobianos que son inhibidores de la síntesis de proteínas o ácidos nucleicos, como aminoglucósidos, fluorquinolonas, cetólidos, metronidazol y amfotericina. La persistencia del efecto es moderada en los macrólidos, tetracilinas, gliciliclinas, clindamicina oxazolidinonas o glicopeptidos y es prácticamente inexistente en los agentes betalactámicos.

La mayor limitación de los estudios antes de los 90 fue que estas relaciones concentración-efecto *in vitro* se determinaron en condiciones estáticas mientras que en la práctica clínica, las concentraciones sistémicas fluctúan debido al proceso farmacocinético (absorción, distribución, metabolismo y eliminación de los fármacos del organismo). Integrando las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de la interacción antimicrobiano-microorganismo se establecen las relaciones farmacocinéticas-farmacodinámicas (FC/FD) que más tarde se emplean en la evaluación de regímenes de dosis, desarrollo de nuevos antimicrobianos y el establecimiento de los puntos de corte de sensibilidad microbiológica (tabla 2).

**Tabla 2.** Patrones de actividad antimicrobiana y su relación con los parámetros farmacocinéticos.

	Patrón 1	Patrón 2	Patrón 3
Características farmacodinámicas	Muerte bacteriana concentración dependiente con efecto persistente moderado o prolongado	Muerte bacteriana tiempo dependiente con efectos persistentes mínimos o moderados	Muerte bacteriana tiempo dependiente con efectos persistentes prolongados
Antimicrobianos	Aminoglucósidos, cetólidos, fluorquinolonas, daptomicina, metronidazol	Betalactámicos, macrólidos, clindamicina, oxazolidinonas	Azitromicina, Tetraciclinas, glicopéptidos
Régimen de dosis más adecuado	Maximizar concentraciones	Maximizar duración de la exposición	Optimizar cantidad de fármaco
Parámetros farmacocinéticos que determinan la eficacia	$C_{max}$ y AUC	Tiempo por encima de la CMI ( $t > CMI$ )	AUC

Tomado de Craig, 2002 (189)

Estas relaciones FC/FD determinan que la eficacia terapéutica está íntimamente ligada a parámetros farmacocinéticos específicos. Para los antimicrobianos caracterizados por un patrón concentración dependiente donde al aumentar la concentración aumenta la eficacia, los parámetros concentración máxima ( $C_{max}$ ) y área bajo la curva (ABC, en adelante AUC) determinarán la eficacia *in vivo*. Para los antimicrobianos dependientes del tiempo con efectos

no persistentes el tiempo que las concentraciones se sitúen por encima de un umbral, por ejemplo la CMI, determinará su eficacia clínica. Para los antimicrobianos tiempo-dependientes, con persistencia del efecto moderada o prolongada el AUC será el principal parámetro farmacodinámico que determine la eficacia *in vivo* (189). La integración de las características FC/FD sugieren que el efecto de la fluctuación de las concentraciones con el tiempo es marcadamente diferente en las diferentes clases de antimicrobianos y directamente relacionado con el patrón de actividad bactericida.

### 1.2.3 Índices farmacocinéticos/farmacodinámicos

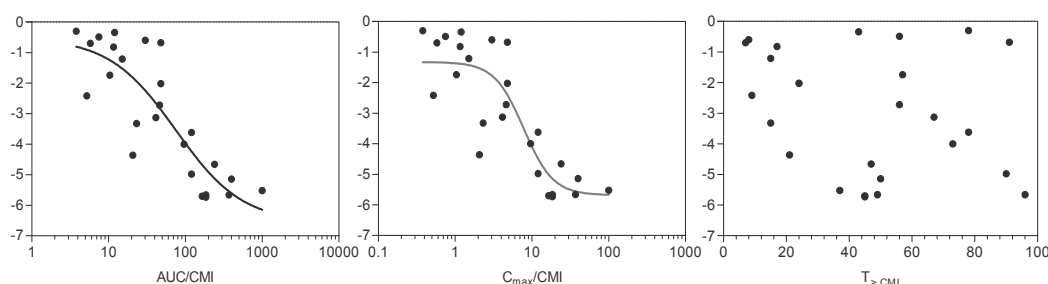
Durante las últimas dos décadas las relaciones farmacocinéticas/farmacodinámicas (FC/FD) han estado fundamentadas en tres índices FC/FD integrados por los parámetros farmacocinéticos que determinan la eficacia terapéutica, o resúmenes de la exposición, y la CMI del microorganismo: el AUC/CMI, la  $C_{max}/CMI$  y el  $T_{>CMI}$  (191,192). Existen otros aunque menos extendidos en uso como el  $AUC_{>CMI}$  o el  $AUC/CMI.t_{>CMI}$  (193). La nomenclatura de estos índices FC/FD se ha estandarizado (194); el prefijo,  $f$ , se introduce para indicar que la fracción libre, no unido de la droga se usó en los cálculos ( $fAUC/CMI$ ,  $fC_{max}/CMI$  o  $fT_{>CMI}$ ). Si no se indican subíndices se asume que los cálculos AUC y  $T_{>CMI}$  se basaron en un intervalo de 24 horas, en condiciones de estado estacionario.

El índice dominante o principal se determina mediante el trazado comparativo de los diferentes efectos obtenidos con diferentes magnitudes de los índices (figura 1). Generalmente los trazados se generan ajustando ambas variables, índices FC/FD y efectos con modelos no lineales. El índice FC/FD principal será el de mejor ajuste (coeficiente  $r^2$  más alto).

La identificación del índice FC/FD principal o mejor índice para una combinación fármaco-bacteria es complicada debido a la elevada interdependencia que muestran los tres índices y requiere de un diseño del experimento apropiado. Si al aumentar la dosis aumenta el efecto y por igual aumentan los cocientes  $C_{max}/CMI$ ,  $AUC/CMI$  y  $T_{>CMI}$  el índice FC/FD principal será difícil de identificar. La interdependencia entre los tres índices FC/FD disminuye cuando se emplean estrategias de escalamiento (dosis mayores administradas en un mismo intervalo de dosificación) o fraccionamiento (la misma dosis total se administra en un tiempo definido como dosis única en dos, tres o cuatro dosis) de dosis (189,195-197). Usando diferentes regímenes de dosis en modelos animales de infección o en sistemas FC/FD *in vitro*, y variando ambas frecuencia y dosis se ha demostrado la relación entre un índice FC/FD y la eficacia (tabla 3) (189,195-197). En el caso de los betalactámicos únicamente el  $T_{>CMI}$  ha sido adecuadamente correlacionado con la actividad antimicrobiana. Sin embargo tanto aminoglucósidos como fluorquinolonas se correlacionan óptimamente tanto con el  $AUC/CMI$  y la  $C_{max}/CMI$  (figura 1) (195,198,199). Aunque vancomicina, tetraciclinas, gliciliclinas, macrólidos, oxazolidinonas o clindamicina exhiben una actividad dependiente del tiempo de exposición, el  $AUC/CMI$  ha sido el índice que mejor se ha correlacionado con la eficacia terapéutica de estos antimicrobianos en animales (200-202) o *in vitro* (203).

**Tabla 3.** Parámetro farmacodinámico dominante en diferentes clases de antimicrobianos

Parámetro farmacodinámico	Antimicrobianos
$t > C_{MI}$	Penicilinas, cefalosporinas, aztreonam, carbapenemas, macrólidos, clindamicina, oxazolidinonas
$C_{max}/C_{MI}$	Aminoglucósidos, fluoquinolas, vancomicina, teicoplanina
$AUC/C_{MI}$	Aminoglucósidos, fluorquinolonas, vancomicina, ketolidos, tetraciclina

**Figura 1.** Representación gráfica de la relación establecida entre los índices FC/FD,  $AUC/C_{MI}$ ,  $C_{max}/C_{MI}$  y  $T > C_{MI}$  y la respuesta antimicrobiana desarrollada por las fluorquinolonas

#### 1.2.4 Magnitud del efecto antimicrobiano

El valor específico del índice FC/FD que es necesario para obtener un efecto antibacteriano, por ejemplo una reducción pronunciada y preestablecida de la población bacteriana expuesta al antimicrobiano con respecto a la población expuesta a placebo, se define como la magnitud diana del índice FC/FD. Este efecto objetivo que determina la magnitud diana del índice consiste generalmente en la reducción de la población en 2 o 3-log UFC/ml o en el 90% del efecto máximo del ajuste dosis-respuesta ( $E_{max}$ ).

Craig sugirió que dada la naturaleza de los índices FC/FD, las magnitudes de estos índices requeridas en la eficacia serían similares en diferentes especies animales y por lo tanto los resultados obtenidos en animales de experimentación serían predictivos de la actividad del antimicrobiano en humanos. Los datos actuales sugieren que la magnitud del índice FC/FD determinado en ratones, en modelos *in vitro* o en modelos mecanísticos apoyados en datos *in vitro* es similar a la magnitud que determina la eficacia clínica (204,205). De hecho actualmente las dosis óptimas y los regímenes de dosificación se determinan empleando las magnitudes de los índices FC/FD obtenidas en los estudios no clínicos, que más tarde se confirman con los resultados de los estudios clínicos (206).

No obstante, aunque la optimización de regímenes de dosis mediante índices FC/FD parece muy intuitiva, hay que resaltar que los índices son meras simplificaciones de la relación FC/FD. Ninguno de los índices FC/FD consigue un ajuste perfecto con la respuesta aun partiendo de un diseño experimental adecuado, en ocasiones diferentes regímenes de dosis originan similares valores en los índices FC/FD pero respuestas diferentes y en otras dos o más índices FC/FD muestran valores similares de ajuste con la respuesta a pesar de su diferente implicación en la selección de regímenes de dosificación óptimos (207). Esto es debido que los índices FC/FD



vierten al análisis los errores que recaen sobre cada una de las variables que la integran. Por ejemplo al asumir que un antimicrobiano es dependiente del AUC se asume independencia de la rapidez con la que se hace la administración, es decir los estudios asumen que la muerte bacteriana del índice basado en el AUC será igual para una administración intravenosa y para una administración en infusión continua si el AUC es el mismo. Para un antimicrobiano que es dependiente de la  $C_{max}$  se asume independencia de la vida media de eliminación, cuando estos serán muy sensibles a la longitud de la infusión, es decir al aumentar la longitud de infusión se estima un menor efecto antibacteriano. Y por último para un antimicrobiano tiempo dependiente se asume que su efecto máximo es por encima de la CMI cuando se demostró que el efecto máximo ocurre a 4-5 veces la CMI (192). No hay que olvidar tampoco los errores que se relacionan con la CMI que se asume constante durante todo el periodo de estudio (205).

El desarrollo de la relación FC/FD ha permitido identificar los factores que pueden determinar variaciones en las magnitudes de los índices FC/FD que se asocian con la eficacia terapéutica (192,205,208,209). Las relaciones FC/FD que se establecen con índices que dependen de parámetros farmacocinéticos procedentes de una población de pacientes característica, no pueden ser directamente aplicadas a otras poblaciones de pacientes. Por ejemplo los pacientes con una reducida función renal, ancianos o neonatos presentaran una mayor vida media en comparación con la población normal lo que modificará las estimaciones de eficacia (205). En este mismo sentido las estimaciones varían si las concentraciones diana proceden de plasma o de tejidos (210). En cambio no se modifican empleando diferentes regímenes de dosis (192, 201).

La magnitud de los índices FC/FD es diferente en las diferentes clases de antimicrobianos e incluso entre antimicrobianos pertenecientes a una misma clase (192,205). Sin embargo estas diferencias entre moléculas de la misma clase suelen desaparecer ajustando las estimaciones de los índices a la fracción libre de concentraciones en plasma, por lo que la unión a proteínas es un factor modificador de la magnitud del índice FC/FD. Esto se ha observado entre betalactámicos, entre fluorquinolonas y entre macrólidos (192).

La magnitud de los índices FC/FD es diferente en los distintos microorganismos. Por ejemplo en modelos animales se estima que el  $T_{>CMI}$  que se requiere para obtener eficacia frente a los estafilococos es menor que la magnitud requerida en bacilos gramnegativos y estreptococos (208). Modelos animales y modelos *in vitro* han demostrado también la necesidad de menores AUC/CMI para *S. pneumoniae* (AUC/CMI de 25-50 horas) que para *K. pneumoniae* o *P. aeruginosa* (AUC/CMI >125 horas) (211,212) empleando quinolonas.

No obstante existen diferencias considerables en las magnitudes diana establecidas en diferentes estudios probablemente por una falta de estandarización de las aproximaciones FC/FD *in vitro* e *in vivo* (209). Cocientes AUC/CMI >40 h de las fluorquinolonas han demostrado reducir la población de *S. pneumoniae* de 4 a 5-log (211) y en otros casos un AUC/CMI >60 horas solo se asoció con un 50% del efecto máximo que fue alcanzado con exposiciones de >250 horas (213-215). En ratones no neutropénicos la máxima supervivencia

frente al *S. pneumoniae* se asoció a un cociente de AUC/CMI de 25 horas, (216), en claro contraste con los resultados obtenidos en conejos (217) o en ensayos clínicos en humanos donde un cociente AUC/CMI <30 h se ha relacionado con bajas probabilidades de éxito clínico (218,219).

En resumen, la eficacia de cada antimicrobiano estará conducida, mayoritariamente, por un índice FC/FD dominante específico y la magnitud que determina la eficacia terapéutica será exclusiva para cada especie bacteriana teniendo en consideración la forma de administración del antimicrobiano, la distribución en el organismo y población de pacientes diana (192).

### **1.2.5 Probabilidad de alcanzar la diana terapéutica**

Las magnitudes de los índices farmacodinámicos empleadas para determinar la eficacia terapéutica o para la determinación de los puntos de corte de sensibilidad microbiológica para predecir la probabilidad de éxito del tratamiento deber ser útiles no solamente para la media de la población sino que también deben pronosticar estos eventos en todos los individuos de la población. Dado que la farmacocinética es variable según los individuos y la farmacocinética es parte de la relación FC/FD, las magnitudes diana de los índices también variarán.

Este problema fue resuelto en 2001 por Drusano y cols (220) al introducir una aproximación estocástica denominada simulación de Monte Carlo, que integraba la farmacocinética poblacional con la información de sensibilidad microbiológica.

La aproximación estima los parámetros farmacocinéticos individuales procedentes del modelo farmacocinético poblacional de un régimen de dosis específico y genera el perfil concentración-tiempo desde donde se calculan las magnitudes del índice FC/FD para cada individuo de la población. Basándose en la distribución de las magnitudes individuales de los índices FC/FD se pronostica la probabilidad de alcanzar la diana terapéutica o magnitud del índice relacionada con la eficacia terapéutica en la población examinada. En el ejemplo que propuso Drusano y cols, al comité de admisiones de productos infecciosos de la FDA, empleó diferentes tipos de dianas terapéuticas para evernimicina basadas en los resultados experimentales que obtuvieron en ratones neutropénicos, el efecto relacionado con la dosis estática, la relacionada con la reducción de la muerte bacteriana de 1 a 3-log UFC/ml y con el 90% del efecto máximo. La probabilidad de alcanzar la diana fue comparada para dos regímenes de dosis diferentes en especies distintas (220).

Para investigar la probabilidad de alcanzar la diana terapéutica (PTA), se simula una población amplia de pacientes ( $n=1000$  a  $10.0000$ ) y la proporción de sujetos simulados por encima de la diana terapéutica preestablecida se calcula para un intervalo de valores de CMI y régimen de dosis. La proporción de sujetos con valores del índice FC/FD por encima de la diana constituyen de PTA para cada valor de CMI. Generalmente la PTA se representa como una función de la CMI para un régimen de dosis y diana terapéutica dada y se acompaña de una evolución descriptiva de la distribución de CMI para la especie estudiada (221). Se asume un valor del

90% para asegurar una alta probabilidad de cura clínica, aunque se está estudiando la aplicación de otros límites como 95% o 99,9% (222).

Las simulaciones de Monte Carlo presentan tres puntos débiles que recaen en los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos, que deben ser fortalecidos durante el diseño del experimento.

El primero recae en los datos farmacocinéticos iniciales empleados en la simulación. El resultado de la simulación es directamente dependiente de los valores de los parámetros farmacocinéticos seleccionados y de su medida de la dispersión. Las diferencias en los parámetros farmacocinéticos estimados en voluntarios y pacientes, o entre diferentes poblaciones de pacientes influyen en la pendiente de la curva PTA. Los estudios farmacocinéticos de fase I o II incluyen pequeñas series de sujetos pertenecientes a poblaciones muy homogéneas. El aumento de la variabilidad reflejará mejor a la población en estudio y resultará en menores probabilidades para alcanzar las dianas terapéuticas en los puntos de interés (222).

El segundo está relacionado con la selección de la magnitud del índice farmacodinámico asociada con la eficacia terapéutica. La magnitud del AUC/CMI que habitualmente se asocia con la eficacia terapéutica frente a los organismos gramnegativos oscila entre las 100-125h, sin embargo en algunos estudios se han empleado valores muy superiores y en otros muy inferiores. Forrest y cols, establecieron que clínicamente la probabilidad de éxito por encima de un valor de 125 es superior a un AUC/CMI inferior, sin embargo la probabilidad es muy superior cuando el AUC/CMI es superior a 250h (223). Del mismo modo en modelos animales han sido empleados indistintamente la dosis relacionada con bacterioestasis o la que resulta en reducciones de 1 o 2-log UFC/ml en 24 horas y la probabilidad de éxito clínico difiere significativamente en los tres casos.

Por último se asume que la magnitud diana del índice FC/FD es un valor fijo que no admite variabilidad. Sin embargo recientemente MacGowan y cols., 2009 desarrollaron una simulación de Monte Carlo que incluyó la dispersión de la diana FC/FD calculada en diferentes cepas, originando cambios significativos en la PTA que influyeron en la determinación de los puntos de corte (224).

### **1.3 Aplicación de la relación FC/FD en el desarrollo de antimicrobianos y en el sondeo de los puntos de corte de sensibilidad microbiológica**

La importancia de la relación entre la concentración y el efecto en los antimicrobianos ha propiciado que la investigación de la relación FC/FD sea sugerida como altamente recomendable para el desarrollo de nuevos antimicrobianos (206,225,226). La aproximación FC/FD es determinante durante las fases preclínicas iniciales del desarrollo al aportar información precisa sobre los índices FC/FD que mejor se correlacionan con el efecto antimicrobiano obtenido en modelos farmacodinámicos *in vitro* y modelos de infección animal y sobre si las magnitudes diana que se relacionan con el máximo efecto se alcanzan en humanos para los microorganismos a los que está dirigida la terapia. En una fase posterior, tras la estimación de los parámetros farmacocinéticos en voluntarios y su dispersión, la FC/FD facilita el diseño, la simulación de regímenes de dosis (simulación de Monte Carlo) y su comparación de acuerdo a la probabilidad de alcanzar las dianas preestablecidas en los estudios experimentales. Los regímenes de dosis con mayor probabilidad de éxito terapéutico y más distantes de la dosis que limita los efectos tóxicos son sistemáticamente seleccionadas para las fases de desarrollo 2/3 (225,226).

Mediante la aproximación FC/FD no solo se acelera el desarrollo en esta fase de investigación sino que además de maximiza la probabilidad de que los regímenes seleccionados para los ensayos de fases 2/3 sean efectivos y eviten el desarrollo de los clásicos estudios de búsqueda de dosis.

La aplicación de las relaciones FC/FD han demostrado ser de gran utilidad en el desarrollado de nuevos regímenes de dosis o de formulaciones de antimicrobianos ya comercializados. Han resultado de interés en el estudio de las ventajas de la administración en infusión continua o en infusión prolongada, que se asocian con un incremento en los niveles mantenidos por encima de la CMI, frente a la administración intermitente de los betalactámicos (227-229). La aplicación de las relaciones FC/FD han facilitado el desarrollo de formulaciones de liberación sostenida como la presente en la combinación de amoxicilina-clavulánico 2000:125 mg. La formulación aumenta el tiempo que las concentraciones exceden en suero para cepas de *S. pneumoniae* o *H. influenzae* con una CMI de 4 y 8 µg/ml, valores ligados a los puntos de corte de sensibilidad microbiológica en estas especies (230,231).

Esta forma de seleccionar regímenes de dosis óptimos basados en la probabilidad de éxito frente a un organismo patógeno en concreto cambia también la manera clásica para establecer los puntos de corte de sensibilidad microbiológica. Anteriormente a la aplicación de las relaciones FC/FD al desarrollo de antimicrobianos los regímenes se aplicaban y posteriormente se establecían los puntos de corte de sensibilidad microbiológica. Ahora los regímenes se establecen basándose en los puntos de corte (206).

El escenario ideal contemplaría el desarrollo de ensayos clínicos que valoren la respuesta de los pacientes y las ordenen por CMI del microorganismo responsable de la infección. De llevarse a cabo la determinación de los puntos de corte de sensibilidad microbiológica se calcularían

exclusivamente a partir de los datos clínicos. Desafortunadamente esto no es probable ya que los pacientes enrolados en los ensayos clínicos están infectados por cepas que a priori son sensibles a la terapia. De este modo el comportamiento de la terapia frente a organismos con mayores CMI es desconocido y hace imposible establecer un verdadero punto de corte. Dado que los datos clínicos no pueden aportarnos la clave, los puntos de corte de sensibilidad microbiológica dependen básicamente de los datos microbiológicos (microorganismos diana, distribución de la sensibilidad), de los datos farmacocinéticos, de los datos farmacodinámicos procedentes de modelos animales e in vitro (magnitud diana del índice FC/FD que pronostica la respuesta clínica) y el modelado FC/FD de los datos incluyendo las simulaciones de Monte Carlo. Los datos clínicos son empleados entonces para confirmar o afinar estos puntos de corte microbiológicos preestablecidos (206,232,233).

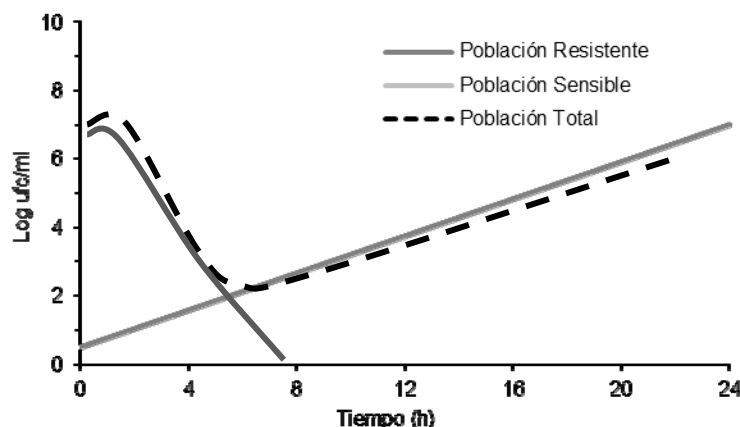
### **1.3.1 Relación FC/FD en la prevención de resistencias**

Las bacterias son propensas a adaptarse en el ambiente y desarrollar resistencias durante la exposición a los antimicrobianos bien por la adquisición de elementos móviles que contienen determinantes de resistencias o por mutaciones puntuales que modifican las dianas terapéuticas. Una vez que se produce la mutación, las probabilidades de que la bacteria revierta su resistencia son bajas, siendo habitual que esta nueva mutación aumente el fitness de la bacteria (234). Los índices FC/FD no pueden caracterizar los cambios en la sensibilidad durante el periodo en estudio y por lo tanto estarán excluidos de las estimaciones de la aproximación FC/FD si no son tenidos en cuenta de manera especial. Ante este aumento de la incidencia de resistencia a los antimicrobianos el modelo de estudio de la relación FC/FD ha sido rediseñado y son múltiples los ejemplos que identifican la magnitud del índice FC/FD que previene de la aparición de resistencias en detrimento de la magnitud relacionada con la eficacia terapéutica (197-199,215,235,236). Los primeros estudios a este respecto refieren de la necesidad de cocientes de  $C_{max}/CMI$  de 8-10 para prevenir la aparición de resistencias en *P. aeruginosa* con aminoglucósidos y fluorquinolonas (199,237).

Existen evidencias clínicas y experimentales de la influencia de la selección del esquema de dosis en la aparición de resistencias (204,215,235,236,238). La magnitud relacionada con la prevención de resistencias es normalmente superior a la magnitud requerida para la eficacia, (215,235,236) aunque varía según el microorganismo e incluso el fenotipo de resistencia, por ejemplo en cepas sensibles y resistentes a metilina en *S. aureus* (239). Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que cocientes de AUC/CMI de entre 30-100h para las fluorquinolonas garantizan la eficacia clínica o microbiológica frente al *S. pneumoniae* (211,240,241). Sin embargo introduciendo la resistencia como variable en los estudios FC/FD se ha sugerido que este cociente debe ser muy superior. En estos casos cocientes de AUC/CMI inferiores a 125 h se asociarían con una alta probabilidad de fracaso clínico (215,217,236).

Esta relación entre el fracaso de la terapia y la aparición de resistencias se explica porque la inusualmente elevada densidad de microorganismos presente en las infecciones nosocomiales

excede la inversa de la frecuencia de mutación para el antimicrobiano que es expuesto (242). Antes del tratamiento (en ausencia de presión selectiva) es probable que la población contenga una pequeña proporción de organismos resistentes mezclados en la población total, mayoritariamente sensible. La presión selectiva favorece el desarrollo de los organismos sensibles que paulatinamente reemplazaran a la población (figura 2) (238).



**Figura 2.** Efecto de la dosis en dos subpoblaciones diferentes. La subpoblación sensible se elimina rápidamente y es sustituida progresivamente por la subpoblación resistente representando a toda la población al finalizar la exposición

La relación entre la exposición y la selección de resistencias ha sido descrita mediante una función con forma de U invertida sugiriendo la existencia de una ventana de selección de mutaciones o intervalo de concentraciones donde preferentemente se amplifican las resistencias y que fuera de la misma la probabilidad de encontrar resistencias desaparece (235,236,243). Consecuentemente se necesitarían altas concentraciones para prevenir el desarrollo de resistencias y obtener una respuesta clínica satisfactoria (244).

Recientemente se han puesto de relieve diversas prioridades para combatir la aparición de resistencias apoyándose en los conocimientos de la relación FC/FD como herramienta para superar y prevenir el desarrollo de resistencias (222). Algunas de estas sugerencias incluyen el aumento de la dosis, cursos cortos de tratamiento y el uso de combinaciones de antimicrobianos. Abiertamente se sugiere una reevaluación de los regímenes de dosis y de las indicaciones de los antimicrobianos disponibles basado en la nueva información que aporta la aproximación FC/FD.

### 1.3.2 Modelos farmacodinámicos *in vitro* como herramientas en el pronóstico de la relación FC/FD

Los sistemas farmacodinámicos *in vitro* son en la actualidad herramientas imprescindibles para el estudio de las relaciones FC/FD. Destacan por su flexibilidad, adaptabilidad, sencillez, relativo bajo costo y buena correlación con las estimaciones procedentes de otras fuentes de estudio de las relaciones FC/FD como son los modelos experimentales con animales y los ensayos en

humanos (206,245). Los modelos animales son comparables en muchos sentidos a los ensayos en humanos, imitan las características de la infección, las condiciones de crecimiento de las bacterias y la valoración de la respuesta se define en términos similares de curación o muerte (246).

En cambio, al margen del componente ético que envuelve el uso de animales, los sistemas *in vitro* demuestran ventajas fundamentales en la capacidad para reproducir la farmacocinética o el estudio de la relación FC/FD con la prevención de resistencias (245,246). Mientras que con la experimentación animal es necesario recurrir a métodos que trasladen la farmacocinética de ratones a humanos (humanización de las dosis), los sistemas *in vitro* imitan el perfil de concentraciones de dosis y regímenes de dosis observado en plasma u otros compartimentos humanos. Del mismo modo el estudio de las resistencias está muy limitado en los animales de pequeño tamaño dado que es incompatible el estudio de cepas virulentas con la administración de las densidades necesarias para valorar el estudio de la resistencia y su prevención (245).

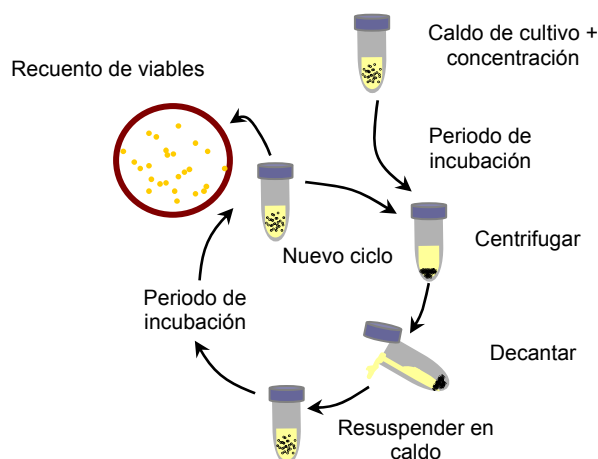
Aunque las estimaciones de eficacia procedentes de los estudios *in vitro* e *in vivo* suelen ser coincidentes (247) es posible encontrar estudios *in vitro* que revelan fuertes inconsistencias. Este problema se encuentra relacionado con la multitud de sistemas *in vitro* que históricamente han sido utilizados para establecer la relación FC/FD y a la falta de estandarización para este tipo de estudios (248).

#### **1.4 Sistemas farmacodinámicos *in vitro***

Greenwood y O'Grady, desarrollaron en 1975 el primer artefacto *in vitro* para valorar la acción dinámica de los antimicrobianos (249). Simularon una infección de vejiga empleando frascos de cristal donde las bacterias se multiplican en medios artificiales. La infección era reproducida mediante alteraciones en el volumen y flujo de paso del medio de cultivo consiguiendo así variar las concentraciones de microorganismo y las del antimicrobiano de acuerdo a una infección *in vivo*. El efecto de los antimicrobianos fue valorado mediante fotometría aunque con poco éxito.

Desde entonces han surgido innumerables sistemas farmacodinámicos aunque todos derivan de un muy reducido número de artefactos. Estos artefactos o prototipos presentan diferencias mecánicas y estructurales notables que aportan características farmacocinéticas y farmacodinámicas muy variables (247). Esta variabilidad depende básicamente de cómo se expone la concentración de antimicrobiano al microorganismo y de la concentración de microorganismo en el sistema (245). De acuerdo a estos aspectos encontramos sistemas de concentraciones constantes sin dilución del microorganismo, sistemas de concentraciones cambiantes con dilución del microorganismo y sistemas de concentraciones cambiantes sin dilución del microorganismo. Los más relevantes para el estudio de las relaciones FC/FD pertenecen a los dos últimos grupos que a su vez se subdividen en sistemas discontinuos o sistemas continuos:

Sistemas discontinuos. Se denominan así por el perfil de concentraciones que originan. En estos sistemas el antimicrobiano se administra a concentraciones constantes durante periodos de tiempo definidos extrapolados de la curva concentración tiempo característica del antimicrobiano, lo que origina un perfil de concentraciones en escalera. Entre los sistemas discontinuos destacan por su relevancia los sistemas que no originan la dilución del microorganismo durante el proceso como el sistema de centrifugación de Bauerfeind (250) (figuras 3), el sistema de centrifugación-filtración (251,252) (figura 4) y el sistema de microfiltración (252).

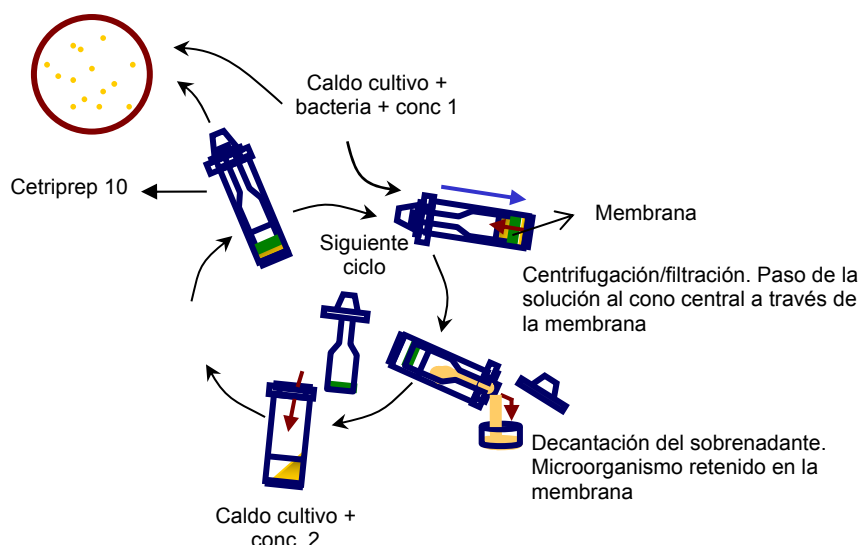


**Figura 3.** Sistema de centrifugación de Bauerfeind

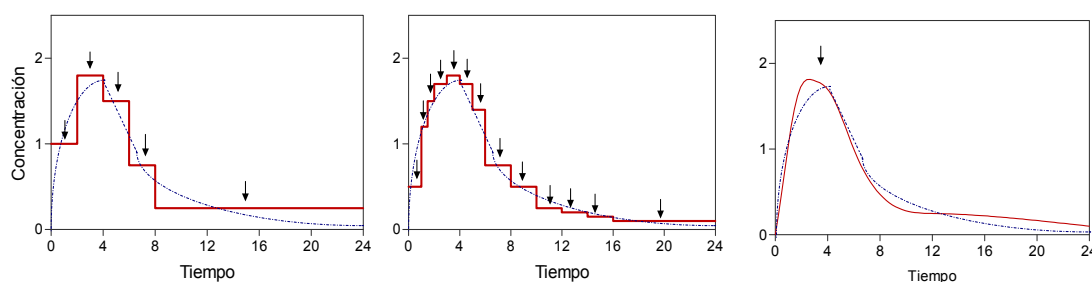
Estructuralmente son artefactos muy sencillos y de mecánica parecida. Consisten en tubos de vidrio o dispositivos comerciales empleados en aplicaciones similares (sistemas Centriped-10 o Sterifil, Merck-Millipore). Los dos primeros sistemas requieren centrifugación para el intercambio de las concentraciones. La centrifugación además de consumir tiempo de incubación reduce el tiempo de exposición neto de las bacterias durante el periodo de estudio. Por este motivo no es factible un número amplio de intercambios (generalmente se reproducen de 4 a 6 concentraciones) o la reproducción de administraciones frecuentes (dosis cada 6-8h) a no ser que los periodos de estudio se limiten específicamente al periodo de dosificación (simulación de 6 u 8 horas) (245,250,251).

En el sistema de microfiltración la centrifugación es sustituida por un proceso de filtración a vacío que a diferencia de la centrifugación es instantánea lo que ofrece la posibilidad de incorporar un mayor número de concentraciones al estudio (252). La microfiltración origina cinéticas más continuas que los sistemas basados en la centrifugación y parámetros farmacocinéticos más parecidos a los parámetros farmacocinéticos diana (figura 5).





**Figura 4.** Proceso de centrifugación-filtración mediante el sistema comercial, Centriprep 10 (Millipore), constituido por una carcasa externa donde depositaremos el caldo de cultivo, antimicrobiano y microorganismo, y un cono central provisto de una membrana (10.000 Kda) en su base, que vía centrifugación permite la filtración selectiva del caldo nutritivo y microorganismos.

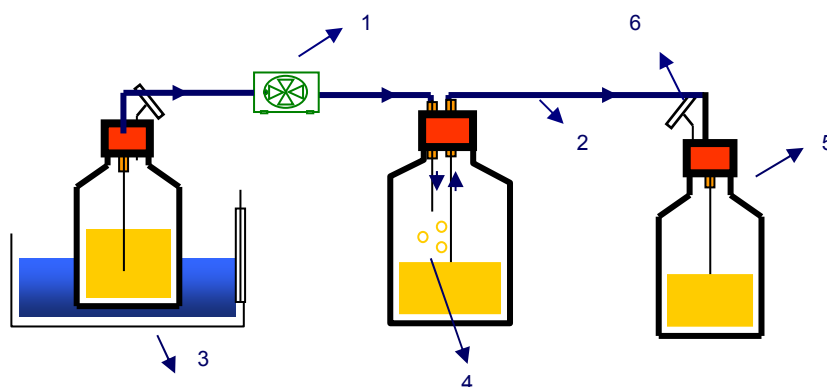


**Figura 5** Diferencias en la farmacocinética simulada con diferentes sistemas *in vitro* (líneas rojas) frente a la observada en humanos (líneas azules). Izquierda, modelo de centrifugación y centrifugación-filtración, Centro, modelo de microfiltración, Derecha, sistemas continuos. Las flechas indican administraciones de dosis.

Sistemas continuos con o sin dilución del microorganismo:

Son los sistemas *in vitro* más números y extendidos en uso. Se fundamentan en un proceso continuo de dilución y eliminación del antimicrobiano con o sin la eliminación simultanea del microorganismo. Constan de uno o dos compartimentos en función de si el compartimento de infección se encuentra separado o no del compartimento cinético. El primer sistema continuo fue desarrollado por Grasso y cols en 1978 (figura 6). Se trata de un sistema de un solo compartimento constituido por tres frascos estériles, un frasco central que contenida medio de cultivo, el antimicrobiano y la bacteria, un frasco de eliminación y un frasco reservorio, conectados entre sí por medio de tuberías. Se consideraba un sistema abierto debido a que los procesos de absorción y eliminación de disponían en frascos diferentes (253). Bombas peristálticas desplazan el contenido del frasco central a un flujo predeterminado hacia el frasco de eliminación y lo reemplazan por un volumen idéntico de caldo fresco procedente del frasco

reservorio. Ajustando los flujos en las bombas peristálticas las concentraciones de antimicrobiano en el frasco central descenderán de forma monoexponencial de acuerdo a la vida media de eliminación en humanos.



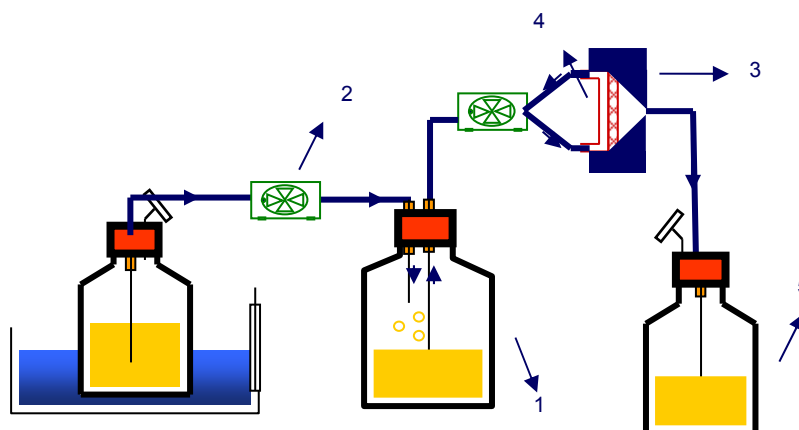
**Figura 6.** Representación esquemática del sistema de Grasso y cols. 1. Bomba peristáltica, 2. Tubería de silicona, 3. Medio fresco, 4. Frasco central, 5. Eliminación, 6. Filtros de aire.

Por su sencillez y sensibilidad ha sido el sistema *in vitro* más reproducido en tres décadas tanto para la evaluación de la actividad de los antibióticos frente a bacterias aerobias (254) como anaerobias (255).

Aunque imitan el perfil de concentraciones humano presentan un importante inconveniente en la valoración farmacodinámica dado que eliminan microorganismo del sistema al mismo ritmo de eliminación del antimicrobiano (245). Este aspecto es especialmente marcado cuando se comparaba la actividad de antimicrobianos con semividas de eliminación muy diferentes, ya que a idéntico tiempo de generación de microorganismo se sobreestima la actividad del antimicrobiano de vida media más corta.

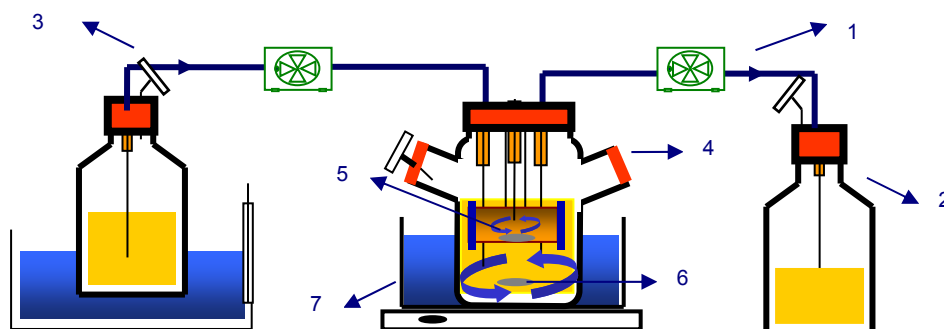
Este problema intentó solucionarse mediante la incorporación de membranas filtrantes pero la excesiva acumulación de microorganismo en la superficie del filtro proporcionaba interpretaciones confusas del efecto antibacteriano (199). Este efecto se redujo en el sistema desarrollado por Navashin y cols, situando un dispositivo de filtración con membranas de tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  entre el frasco central y el frasco de eliminación (figura 7).

El sistema de Shah y cols, disponía de una cámara central circundada por membranas filtrantes como segundo compartimento. El microorganismo se inoculada directamente en esta cámara central donde quedaba confinado. El tamaño de poro de las membranas, 0,45  $\mu\text{m}$ , impedía la liberación del microorganismo pero permitía la libre difusión de nutrientes, desechos del metabolismo y concentraciones de antimicrobiano con el frasco central (figura 8) (258). Capellety y cols, describieron un sistema similar empleando sacos de filtración con un tamaño de poro inferior a 0,1  $\mu\text{m}$  como compartimento de infección (259).



**Figura 7.** Representación esquemática de un sistema de un compartimento con un dispositivo que evita la eliminación del microorganismo. 1. frasco central, 2. Bomba peristáltica, 3. Dispositivo de filtración, 4. Membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ , 5. Eliminación

El problema de ambos sistemas era que la concentración de antimicrobiano entre el compartimento central y de infección nunca llegaba al equilibrio independientemente de la duración el experimento. Con esto las concentraciones del compartimento de infección eran más bajas y retardadas con respecto a las reproducidas en el compartimento central. Aun así tuvieron una importante difusión para la reproducción de administraciones intravenosas. Si estos sistemas se configuran como un sistema cerrado, es decir, sistemas donde los procesos de absorción y eliminación coexisten en el compartimento central, se consiguen perfiles de concentraciones constantes durante la simulación. De esta forma han sido ampliamente empleados en la simulación de infusiones continuas con dosis de carga iniciales (260).



**Figura 8.** Representación esquemática de un sistema de dos compartimentos.

1. Bombas peristálticas, 2. Eliminación, 3. Filtros de aire, 4. Compartimento central, 5. Compartimento periférico, 6. Imán, 7. Baño calefactor agitador

La evolución definitiva de los sistemas *in vitro*, en lo que a estructura se refiere, llegó con la introducción de las unidades capilares, únicas o en serie como dispositivos que albergaban el compartimento de infección (261,262). Las unidades capilares eran cartuchos de fibra hueca recorridos por aproximadamente 150 capilares con poros de 100.000 Kda, conectados al frasco central mediante tuberías de silicona. La disposición de las fibras en el interior del cartucho delimitaba por un lado el espacio extracapilar o compartimento periférico donde se confinaba al

microorganismo y por otro el espacio intracapilar de la fibra hueca que daba continuidad a la tubería de silicona que conectaba el dispositivo al frasco central. La administración del antimicrobiano se realizaba directamente en el cartucho de fibra hueca, desde donde difundía a través de las fibras hacia el compartimento central (261). Estos primeros sistemas presentaron los mismos inconvenientes que el resto de sistemas de dos compartimentos. Los niveles simultáneos de antimicrobiano en ambos compartimentos continuaban siendo significativamente diferentes durante gran parte de la simulación. La incorporación de dispositivos de fibra hueca con una superficie de filtración más amplia redujo considerablemente el problema. Lister y cols, emplearon dispositivos con una superficie de filtración de 1.400 cm<sup>2</sup> y consiguieron el equilibrio de concentraciones entre el compartimento central y de infección en 30 minutos (241).

Los sistemas actuales están dotados de dispositivos con superficies de filtración extremas, volúmenes de cebado reducidos y tamaños de poros más uniformes que junto al soporte informático facilitan un control exhaustivo del proceso farmacocinético (263,228,231).

A diferencia de los primeros sistemas, los sistemas de dos compartimentos actuales permiten la reproducción controlada de administraciones orales, intravenosas o en infusión, o de cinéticas multiexponenciales típicas de las formulaciones de liberación sostenida o de antimicrobianos con una eliminación bi y tri-compartmental (231,264).

Los sistemas híbridos son sistemas continuos de dos compartimentos que sustituyen los dispositivos de retención del microorganismo por compartimentos periféricos que facilitan la reproducción de procesos infecciosos específicos. Entre ellos se encuentran los modelos de catéteres infectados, usados para la reproducción del crecimiento del microorganismo en biofilm (265), modelos de coágulos de fibrina, muy útiles en la reproducción de endocarditis bacterianas (266) o modelos para patógenos intracelulares que emplean líneas celulares incubadas durante prolongados periodos de tiempo con el organismo para facilitar su penetración intracelular (267). Hasta la fecha no han logrado la difusión de los modelos convencionales de uno y de dos compartimentos probablemente debido a la especificidad de los procesos reproducidos o al reducido número de antibacterianos capaces de alcanzar concentraciones elevadas en el interior de las células.

#### **1.4.1 Medidas del efecto antibacteriano**

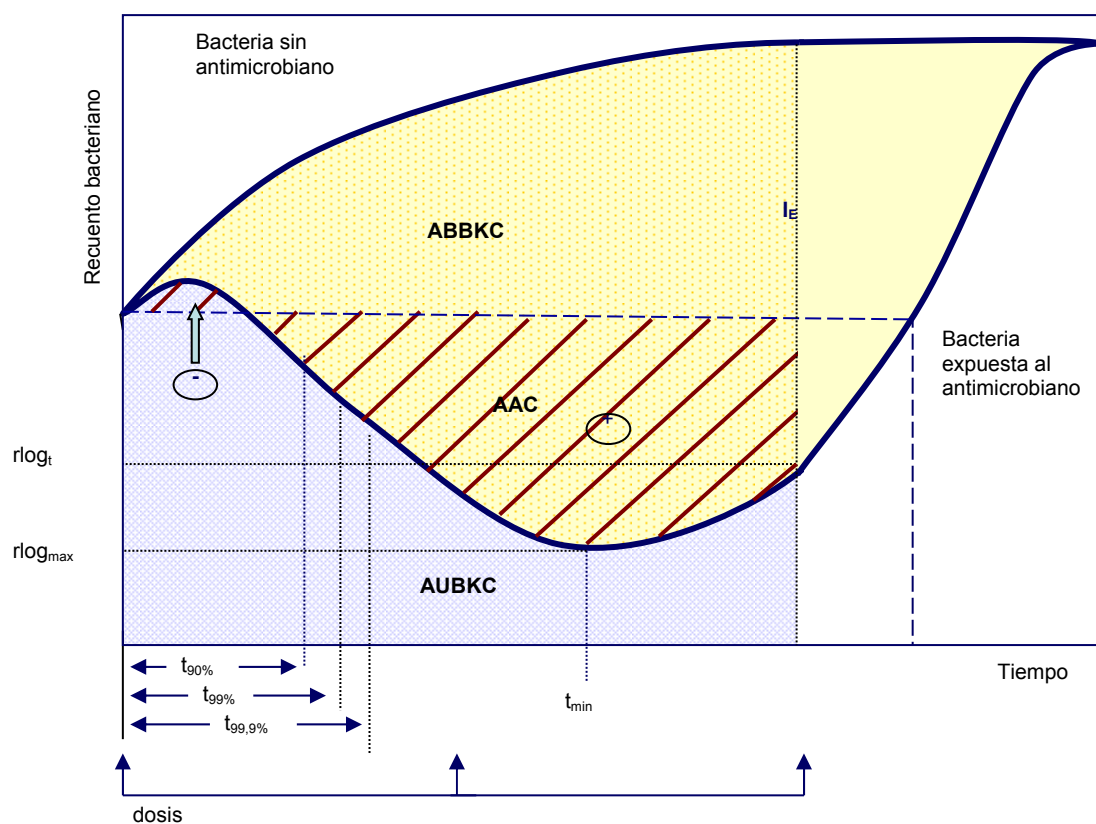
La selección apropiada de las medidas de efecto antibacteriano (EA) es un aspecto controvertido y escasamente discutido en la literatura científica (209,254,268,269).

Existen múltiples EA que consistentemente son empleadas en los estudios FC/FD *in vitro* e *in vivo*, pero no todas demuestran la misma capacidad para correlacionarse con los índices farmacodinámicos (209,254,268,269). En consecuencia la selección de la EA es un factor que influye en el pronóstico de eficacia. Se asume que la relación entre los índices FC/FD y las EA debería mantener una tendencia no lineal sigmoidea o inhibitoria (268), imitando el comportamiento de la respuesta biológica en los ensayos clínicos en humanos (223,270).

Las EA se clasifican en función de su dependencia del tiempo, del recuento de microorganismos o de ambas (figura 9).

Las primeras informan del tiempo que el antimicrobiano necesita para reducir el inóculo inicial en una determinada magnitud, 90%, 99% o 99,9%, ( $t_{90\%}$ ,  $t_{99\%}$ ,  $t_{99,9\%}$ ) o el tiempo que requiere para conseguir un recuento de microorganismos mínimo tras la exposición del agente ( $t_{\min}$ ). Estas medidas suelen expresarse en horas.

Las EA dependientes del recuento de microorganismos viables, cuantifican los cambios en el número de microorganismos con respecto al recuento inicial tras la exposición del antimicrobiano. Suelen cuantificarse a un tiempo determinado, p. ej. 12, 24, 36 o 48 horas ( $r_{12h}$ ,  $r_{24h}$ ,  $r_{36h}$  o  $r_{48h}$  respectivamente) o una vez detectadas las actividades máximas ( $r_{\max}$ ) desarrolladas por el antimicrobiano durante el periodo de simulación. Aunque algunos autores prefieren emplear la forma lineal sin transformar, UFC/ml, su manejo se facilita aplicando transformaciones logarítmicas, en forma de logaritmo en base 10,  $\log$  UFC/ml, o de logaritmo natural,  $\ln$  UFC/ml. A partir de su expresión lineal, y a idénticos tiempos de cuantificación, se deduce el porcentaje de reducción del inóculo inicial (%RII), calculado de acuerdo a la ecuación  $\%RII = 100 - (100 \times I_t) / I_0$  donde  $I_t$  es el recuento de ufc a un tiempo dado e  $I_0$  es el recuento de UFC al tiempo 0 (231).



**Figura 9.** Medidas de efecto antibacteriano utilizadas frecuentemente en los estudios FC/FD

Otras medidas dependen simultáneamente de los cambios en el recuento de microorganismos viables y del tiempo requerido en producirse un determinado efecto. Este grupo incluye las comparaciones a través de la pendiente de curva de muerte bacteriana y las EA que integran áreas generalmente expresadas como  $\log \text{UFC/ml} \times \text{hora}$  o  $\text{Ln UFC/ml} \times \text{hora}$ . Rustige y cols, fueron los primeros en definir una EA con estas características, el AAC o área sobre la curva de muerte bacteriana (271). Más tarde se describieron el AUBKC (198), o área bajo la curva de muerte bacteriana, y su derivado el ABBKC o área entre las curvas de muerte y crecimiento bacterianas (279). Esta última medida es en realidad una estandarización del AUBKC, especialmente interesante en estudios que cuentan con diversas cepas bacterianas que manifiestan un crecimiento poco uniforme en ausencia del antimicrobiano (210,273). Se establece a través del cociente entre el AUBGC o área bajo la curva de crecimiento bacteriano y el AUBKC;  $\text{AUBGC/AUBKC}$ . Mientras que el AAC y el AUBBC son medidas de EA que aumentan de manera proporcionales al incremento de la muerte bacteriana, el AUBKC demuestra un comportamiento inversamente proporcional. Otra medida dependiente del área, es la intensidad del efecto antimicrobiano,  $I_E$ , que a diferencia de las anteriores depende de forma crítica del tiempo necesario en producirse el recrecimiento bacteriano (269).

Medidas como el AUBKC o el ABBKC han tenido una extensa difusión en los estudios farmacodinámicos (138,198,215,254,269).

#### **1.4.2 Cepas usadas o especies bacterianas**

La magnitud del índice farmacodinámico dominante que se relaciona con la eficacia terapéutica es diferente en especies gramnegativas y grampositivas y en microorganismos anaerobios como *B. fragilis* (248). La magnitud es también diferente en las especies con diferentes fenotipos poblacionales, como es el caso del *S. aureus* con la resistencia a metilicina (274). No obstante la magnitud del índice es muy similar en cepas de diferente sensibilidad pertenecientes a la misma especie (189).

En general se recomienda el uso de cepas representativas de la distribución de sensibilidad que presente esa especie frente al antimicrobiano (por ejemplo cepas con una CMI equivalente a la  $\text{CMI}_{50}$ ) y en todo caso diferentes cepas con diferentes mecanismos de resistencia y en todo caso cepas que determinen un amplio intervalo de CMIs, sensibles y resistentes (231,248,279). La selección de cepas muy sensibles puede ocasionar que solo se advierta la erradicación del microorganismo a la o las dosis empleadas excluyendo del análisis y de la estimación de eficacia efectos relacionados con la exposición de valores del índice FC/FD inferiores.

#### **1.4.3 Dosis usadas en la aproximación FC/FD *in vitro***

La mayoría de los estudios simula farmacocinéticas humanas utilizando la vida media terminal del antimicrobiano como valor diana de la simulación. En la mayoría de las simulaciones los datos proceden de voluntarios aunque en algunas han utilizado vidas medias de eliminación procedentes de pacientes con alteraciones renales (275,276).

Es preferible la simulación de dosis múltiples a dosis únicas. Estas últimas tienen una finalidad descriptiva del efecto pero no permiten establecer un pronóstico de eficacia.

La simulación de dosis clínicas únicas frente a uno o múltiples microorganismos de sensibilidad parecida es a primera vista un diseño lógico debido a que aporta un pronóstico del efecto a las concentraciones alcanzadas en la práctica clínica. En el estudio de antimicrobianos en desarrollo el diseño suele complementarse empleando otros antimicrobianos, de la misma o de diferente clase a modo de comparadores. Del mismo modo pueden resultar de interés en la descripción de los efectos del antimicrobiano frente a cepas de la misma especie con diferente mecanismo de resistencia, por ejemplo, influencia en la actividad de la presencia o ausencia de NorA en *S. aureus* (279) o efecto de la quinolonas en presencia o ausencia de mecanismos de expulsión y mutaciones puntuales *parC* y *gyrA* en el *S. pneumoniae* (248).

No obstante el valor predictivo de la eficacia terapéutica es muy reducido debido a que el intervalo de valores que adopta el índice FC/FD es demasiado estrecho y es posible no observar ninguna relación con el efecto.

La simulación de dosis que imiten las concentraciones clínicas frente a múltiples microorganismos con diferentes sensibilidades puede resultar apropiada si se consigue variar adecuadamente el intervalo del índice FC/FD dominante (214). El problema es que en la mayoría de las ocasiones es difícil encontrar un amplio intervalo de organismos de diferente sensibilidad frente a antimicrobianos en desarrollo. En estos casos el intervalo de exposiciones o de valores del índice FC/FD puede no ser lo suficientemente grande como para hacer un pronóstico de eficacia.

Esto puede solventarse al simular diferentes regímenes de dosis de un antimicrobiano frente a un microorganismo o la misma dosis con diferentes semividas de eliminación. Esta estrategia permite expandir el intervalo de valores del índice FC/FD suficientemente pero suele originar relaciones específicas para ese antimicrobiano y no el resto de compuestos de la misma clase o para esa dosificación (277). Esto se atribuye a la fuerte correlación que exhiben los índice FC/FD entre sí.

Para evitar este sesgo y conseguir amplios intervalos del índice FC/FD se recomienda la simulación de una dosis clínica escalada y fraccionada frente a uno o múltiples organismos (248).

#### **1.4.4 Pronóstico del efecto antimicrobiano en la población sensible**

La mayoría de estudios farmacodinámicos desarrollados con los sistemas *in vitro* emplean densidades iniciales de microorganismo que oscila entre  $10^5$ - $10^6$  UFC/ml, donde la presencia de mutantes resistentes espontáneos no es probable. De esta forma la diana principal del antibacteriano será la subpoblación sensible y en consecuencia toda estimación de eficacia terapéutica estará dirigida exclusivamente a esta subpoblación sensible.

Al margen del amplio número de estudios FC/FD *in vitro* meramente descriptivos (197,231,241, 278) en el pronóstico de eficacia de los antimicrobianos han sido empleados múltiples métodos

analíticos. Los análisis univariantes resultan apropiados si se conoce el índice FC/FD dominante de la relación con la eficacia para el antimicrobiano (214). En caso contrario solo tienen un valor estadístico comparativo, apropiado en los estudios que emplean comparadores.

El análisis multivariante se ha empleado con éxito para determinar el índice FC/FD dominante de la relación. Hay que tener en cuenta que los resultados pueden variar sensiblemente en función de la medida de efecto antibacteriano seleccionada (248,269).

La aplicación de modelos lineales (254) y modelos no lineales del tipo dosis respuesta (198,215) han tenido mayor difusión como métodos analíticos. Permiten simultáneamente identificar el índice dominante, establecer la magnitud relacionada con la eficacia terapéutica y permiten realizar comparaciones de eficacia con otros antimicrobianos.

#### **1.4.5 Pronóstico del efecto antimicrobiano en la población resistente**

Por los motivos comentados anteriormente las estimaciones de eficacia de los estudios FC/FD no pueden extrapolarse directamente a la población de bacterias menos sensible.

Hasta hace recientemente poco, la resistencia bacteriana ha sido estudiada de manera infrecuente con los sistemas dinámicos *in vitro* (197-199). Estos primeros estudios pronostican la aparición de resistencias a partir de la relación entre la exposición (valor del índice FC/FD) del antimicrobiano y el efecto antibacteriano pero no cuantifican la aparición de resistencias como tal. Por ejemplo, en el estudio de Blaser y cols se estimó que la aparición de resistencias a netilmicina y enoxacino en *P. aeruginosa* era más frecuente dentro de las primeras 24 horas de tratamiento cuando los cocientes de  $C_{max}/CMI$  eran inferiores a 8, pero no se correlacionó directamente la exposición con datos cuantitativos de la resistencia. De hecho ha sido muy recientemente cuando se ha intentado relacionar la resistencia con la exposición del antimicrobiano utilizando datos cuantitativos de la resistencia como objetivo (235,236,279-282,243,244). Los estudios que estiman dosis protectoras de la selección de mutantes resistentes que no contemplan el análisis directo de la relación entre la exposición y la resistencia como medida final deberían ser considerados cuidadosamente. Por ejemplo, estudios con fluorquinolonas han estimado que cocientes de AUC/CMI desde 30h hasta las 43.500h protegen de la aparición de resistencias en el *S. pneumoniae* (279). Esta variabilidad obedece principalmente a un diseño experimental deficiente en lo referente a la selección de cepas en número y sensibilidad y dosis simuladas. Por ejemplo un estudio que incluyó un intervalo de exposiciones amplio pero mayoritariamente asociadas con erradicación con lo que solo un 30-50% de los experimentos aportaron relación con la resistencia (279) exposiciones se asociaron con erradicación impidiendo.

Otros factores determinantes son la duración de la exposición y el inóculo bacteriano inicial. La duración de la exposición es dependiente de cada especie. El enriquecimiento de mutantes resistentes a fluorquinolonas en el medio ocurre en el *S. aureus* tras tres o cuatro días de exposición, en *S. pneumoniae* tras dos o tres y en *P. aeruginosa* tras dos o tres (215,283). Del mismo modo el análisis es más reproducible cuando se emplean inóculos iniciales altos ( $10^8$

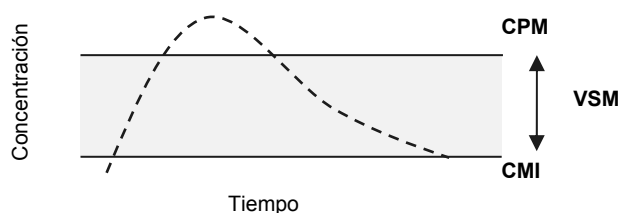


UFC/ml, que de acuerdo al volumen del sistema  $1 \times 10^9$ - $5 \times 10^9$  UFC) en detrimento de los inóculos convencionales (235).

#### 1.4.6 Concentración preventiva de mutaciones y ventana de selección de mutaciones

Al margen de lo comentado, existe un razonamiento más específico que explica porque en la inmensa mayoría de estudios con modelos *in vitro* no se ha observado la esperable relación entre el aumento de la dosis y disminución en la aparición de resistencias. Esta explicación se encuentra en la hipótesis de la ventana de selección de mutaciones (VSM). La VSM es el intervalo de concentraciones donde con mayor probabilidad se produce la amplificación selectiva de mutantes, limita en la parte inferior con la CMI y en la parte superior con la concentración preventiva de mutantes (CPM) (figura 10) (284). La CPM es una medida de potencia que define a la concentración de antimicrobiano que previene la aparición de mutantes de primer paso. Se determina de forma similar a la sensibilidad mediante dilución en agar pero sembrando densidades de bacterias  $>10^9$  UFC, donde por razones probabilísticas se incluirán a las subpoblaciones que incorporen las mutaciones de primer paso (normalmente 1 de cada  $10^6$  o  $10^8$  células).

La hipótesis de la VSM sugiere que las exposiciones o dosis repetidas de un antimicrobiano dentro de la VSM aumentan la probabilidad de enriquecer el medio de mutantes resistentes. Del mismo modo cuando las dosis se sitúan por debajo o por encima de la VSM la probabilidad disminuye aunque el efecto terapéutico es completamente opuesto. El concepto de la VSM ha sido incorporado recientemente en los modelos dinámicos *in vitro* confirmando la hipótesis de la existencia de un intervalo de concentraciones donde la población se enriquece selectivamente con diferentes antimicrobianos y frente a varias especies (235,236,280-283). En estos estudios el pronóstico de la magnitud de los índices FC/FD relacionados con eficacia clínica o con la prevención de resistencias se realizó mediante la correlación entre las dosis expuestas y los datos cuantitativos de resistencias obtenidos de cada simulación empleado modelos no lineales dosis respuesta o de tipo Gauss (235,243).



**Figura 10.** Ventana de selección de mutaciones VSM

La cuantificación de la resistencia se estableció a través de los cambios en el valor de la CMI, la frecuencia de mutación, el análisis del perfil de la población o el recuento específico de viables de la población resistente a un tiempo dado (235,236,243,280-283).

### **1.5 Estudio de las relaciones FC/FD en *S. maltophilia***

Hay evidencias suficientes que confirman la dificultad para establecer infecciones reproducibles en los animales de experimentación (8,285) y en estas circunstancias los modelos FC/FD *in vitro* son las únicas herramientas preclínicas disponibles para el desarrollo de las aproximaciones FC/FD en esta especie (225,226).

En la actualidad no existen referencias de ensayos, estudios de casos o experiencias clínicas que incorporen la relación FC/FD al estudio del tratamiento o la optimización del tratamiento de las infecciones por *S. maltophilia*. La escasa información disponible en la literatura procede de estudios preclínicos desarrollados con sistemas FC/FD *in vitro* de uno o dos compartimentos (118,120,263). Son estudios descriptivos que relacionan el fracaso clínico o la persistencia de las infecciones atribuidas a *S. maltophilia* bajo tratamiento en monoterapia de los antimicrobianos de choque, con la ineficacia *in vitro* (120,138) o el rápido desarrollo de resistencias (118,138) o la necesidad de valorar con escepticismo los resultados procedentes de los estudios de sensibilidad convencionales (118). Actualmente no hay ningún trabajo que haya explorado la relación FC/FD en *S. maltophilia* como guía para establecer un pronóstico de eficacia o la optimización de dosis eficaces en agentes antibacterianos con suficiente actividad frente al microorganismo.

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo principal de esta memoria es la evaluación de moxifloxacino como tratamiento alternativo en las infecciones causadas por *Stenotrophomonas maltophilia* y para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar, comparativamente, la potencia antimicrobiana de moxifloxacino y otros 42 antimicrobianos, incluyendo a los antibacterianos de choque en las infecciones por el microorganismo, cotrimoxazol y ticarcilina-ácido clavulánico en aislados clínicos de *S. maltophilia* genéticamente diferentes procedentes de diferentes centros hospitalarios de nuestra geografía. Como objetivo secundario se valoró el impacto de la introducción de aislados clínicos repetidos en las series de estudio y del método de sensibilidad como factores modificadores potenciales de los resultados de sensibilidad en esta especie.
2. Comparar el poder predictivo de la CMI en el éxito clínico de las fluorquinolonas, en función de los puntos de corte microbiológico propuestos para esta especie y adoptados de especies relacionadas, con el pronóstico de la eficacia clínica de la relación farmacocinética-farmacodinámica establecida con un sistema de microfiltración *in vitro*. Como objetivos secundarios se propusieron:  
Valorar comparativamente la farmacodinámica de las fluorquinolonas y la aparición de resistencias bajo tratamiento.  
Valorar el impacto de las medidas de efecto antibacteriano en el ajuste dosis-respuesta.  
Valorar el impacto del método de sensibilidad en el ajuste-dosis respuesta.
3. Caracterización de los mecanismos de resistencia adquirida a fluorquinolonas en los mutantes resistentes seleccionados durante el tratamiento *in vitro*.
4. Valorar la combinación de las fluorquinolonas con inhibidores de amplio espectro de los sistemas de expulsión como estrategia para evitar la aparición de resistencias durante el tratamiento.
5. Optimización de dosis de moxifloxacino en el tratamiento de las infecciones por *S. maltophilia* empleando un sistema farmacodinámico de dos compartimentos.  
Como objetivos secundarios se propusieron:  
Identificación del índice FC/FD que pronostica la eficacia clínica de moxifloxacino.  
Identificación de la magnitud que pronostica la eficacia clínica de moxifloxacino.  
Identificación de la magnitud que pronostica la eficacia clínica de moxifloxacino y previene de la aparición de resistencias.  
Establecer el punto de corte farmacodinámico para moxifloxacino y la probabilidad de éxito del tratamiento en los pacientes infectados.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3.1 Microorganismos

Se estudiaron un total de 124 cepas de *S. maltophilia* procedentes de especímenes obtenidos en diferentes hospitales de nuestra geografía; hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo, Toledo ( $n=27$ ), hospital Universitario de Salamanca, Salamanca ( $n=21$ ), hospital Clínico San Carlos, Madrid ( $n=19$ ), hospital Gregorio Marañón, Madrid ( $n=16$ ), hospital Severo Ochoa, Madrid ( $n=11$ ), hospital Clínico Universitario de Zaragoza, Zaragoza ( $n=8$ ), hospital Puerta de Hierro, Madrid ( $n=5$ ), Clínica Moncloa, Madrid ( $n=3$ ), Hospital clínico de Barcelona, Barcelona ( $n=3$ ), Hospital comarcal de Alcázar de San Juan, Ciudad Real ( $n=2$ ), Hospital Ramón y Cajal, Madrid ( $n=2$ ). El resto de aislados ( $n=7$ ), procedieron de diversos centros ubicados en, Madrid, Valencia, Sevilla, Las Palmas, Murcia, San Sebastián y Burgos.

Las cepas fueron aislamientos clínicos procedentes de muestras respiratorias ( $n=58$ ), urinarias ( $n=36$ ), hemocultivos ( $n=18$ ), heridas ( $n=9$ ), líquidos ( $n=2$ ) y de origen ambiental (1 cepa procedente de un equipo de respiración), obtenidas entre los años 2002-2005 de 107 pacientes diferentes ingresados en diferentes unidades. Los aislamientos repetidos obtenidos consecutivamente de un mismo paciente no fueron excluidos si el origen clínico fue diferente.

Los aislados fueron identificados en los hospitales de origen mediante los sistemas PASCO (BD, Franklin Lake, NJ) o WIDER (Frco. Soria Melguizo, Madrid, España) y posteriormente en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina mediante galerías API 20NE (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia).

### 3.2 Discriminación genotípica de las cepas de *S. maltophilia*

Los aislados clínicos recibidos fueron clasificados genéticamente de acuerdo al perfil de macrorestricción de los fragmentos de ADN generados tras digestión con la endonucleasa *Xba*I y posterior separación mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (6,286). El procedimiento consta de las siguientes etapas:

1. Extracción del ADN cromosómico. Colonias bien diferenciadas procedentes de un cultivo reciente de 16-20 horas en agar Mueller-Hinton (BD) suplementado con un 5% de sangre de carnero (MHSS), fueron suspendidas en tampón SE (ClNa 75 mM, 25 mM EDTA). La mezcla convenientemente homogeneizada y ajustada mediante espectrofotometría ( $A_{420}=0,9-1,1$ ) se suspendió en agarosa multipurpose (BioRad, Hercules, CA) al 1% en tampón SE. La solución precedente se incorporó en moldes de 1x1 cm y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Los bloques de agarosa con el microorganismo embebido se incorporaron junto a la solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,2, 50 mM EDTA, 1% (p/v) de lauril-sarcosil y 1 mg/ml de proteinasa K (Roche, Basel, Suiza), e incubaron durante 16 horas a 56°C. Este proceso se repitió en dos días consecutivos. Posteriormente bloques se lavaron en al menos 5 ocasiones con tampón TE (10 mM Tris HCl, 0,1 mM EDTA) y almacenaron a una temperatura de 4°C.
2. Digestión del ADN. Porciones de los bloques estabilizadas con 100  $\mu$ l del tampón de reacción del enzima durante 30 min a 4°C se sometieron a digestión con 30 U/ml del enzima *Xba*I (New

England Biolabs, Ipswich, MA) durante 18 h a 37°C. La endonucleasa *Xba*I originó cortes infrecuentes en la secuencia de ADN en las posiciones, T↓CTAGA (61).

3. Separación de los fragmentos y visualización del ADN. Los bloques de agarosa una vez digeridos fueron incorporados a un gel de agarosa (pulsed field agarose, BioRad) disuelta al 1,2 % en tampón TBE 0,5X (TBE 10X: 44,5mM tris-borato/ EDTANa<sub>2</sub> 1nM pH 8). La separación de los fragmentos generados mediante digestión con la endonucleasa se realizó empleando el sistema CHEF-DRII (BioRad), aplicando las condiciones de electroforesis descritas a continuación:

Rampa	Pulsos	Tiempo (h)	Voltaje	T <sup>a</sup>
	Inicial → final			
1	10s → 60s	24	5,4 V/cm (180 V)	12° C
2	5s → 20s	5	5,4 V/cm (180 V)	12° C

Los carriles exteriores de cada gel se reservaron para el marcador de peso molecular, fago lambda, que permitió la identificación de fragmentos con un peso molecular definido de entre 48,5 y 970 Kbp (BioRad). Los geles fueron teñidos en solución de 1 µg/ml de bromuro de etidio (BrEt) en agua destilada durante 40 minutos, y parcialmente desteñidos durante 30 minutos en continua agitación. Los geles una vez visualizados con luz ultravioleta, fueron digitalizados empleando el sistema Geldoc 2000 (BioRad).

4. Definición de los perfiles y relación filogenética. Los fragmentos de restricción de ADN fueron visualmente comparados e interpretados de acuerdo al criterio de Tenover y cols. (287). Este criterio establece que dos cepas son indistinguibles cuando no existen diferencias ni en el número ni en la posición de las bandas generadas. Las cepas están relacionadas si difieren en 2-3 bandas, posiblemente relacionadas si hay diferencias en 4-6 bandas y diferentes si difieren en más de 7 bandas.

El análisis de los diferentes patrones de bandas de PFGE obtenido, fue realizado empleando el software Diversity database (BioRad). Las bandas fueron identificadas automáticamente y posteriormente corregidas de forma manual, especialmente cuando de acuerdo al criterio anterior, distintos aislados mostraron idénticos perfiles de restricción con *Xba*I. En el análisis solo se incluyeron aquellos fragmentos con un peso molecular superior a los 48 Kbp, debido a que fragmentos inferiores no mostraron una buena resolución. La similitud genética existente entre los aislados, fue establecida mediante el coeficiente de correlación de Dice (288), basado en la presencia o ausencia de bandas en el perfil a un peso molecular dado. Del análisis resultó una matriz de correlaciones genéticas entre perfiles y un árbol filogenético o dendograma que agrupó a los perfiles más parecidos entre sí, de acuerdo al método algorítmico de agregación, UPGMA. Las cepas con un perfil de macrorestricción idéntico (100% de similitud genética) fueron consideradas cepas isogénicas o repetidas. Las cepas estuvieron clonalmente

relacionadas cuando las similitudes genéticas fueron  $\geq 80\%$  (286). La posición de tolerancia se estableció en el 1%.

### 3.3 Sensibilidad antimicrobiana

#### 3.3.1 Métodos de sensibilidad

Los métodos de sensibilidad empleados en diferentes apartados de esta memoria se desarrollaron, con pequeñas modificaciones, de acuerdo a las recomendaciones del CLSI (158) o en su defecto siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente;

**Dilución en agar.** Colonias diferenciadas de cada cepa, procedentes de un cultivo reciente (16-20h) en agar MHSS, se suspendieron en solución salina estéril y ajustaron a un  $10^8$  UFC/ml (0,5 McFarland). Una dilución 1:10 de este inóculo estandarizado (inoculo final de  $10^7$  UFC/ml) se incorporó a los pocillos de un replicador de Steers (Sigma-Aldrich, St Louis, MI) que dispensó gotas de 1  $\mu$ l de cada cepa (aproximadamente  $10^4$  UFC por gota) en la superficie de placas de agar Mueller-Hinton sin suplementar y suplementadas con concentraciones dobles seriadas del antimicrobiano en estudio. Se consideró como valor de CMI a la primera concentración de antimicrobiano que impidió el crecimiento visible del microorganismo tras la incubación de las placas en las condiciones referidas más bajo. La detección de una sola colonia, se interpretó como un crecimiento negativo.

**Microdilución en caldo.** Un volumen de cada inóculo estandarizado se diluyó (1:500) en caldo Mueller-Hinton suplementado con 25  $\mu$ g/ml de  $\text{Ca}^{2+}$  y 50  $\mu$ g/ml de  $\text{Mg}^{+}$  (MHS) para obtener un inóculo inicial de  $5 \times 10^5$  UFC/ml. Un volumen de 100  $\mu$ l de esta suspensión precedente se incorporó en los pocillos de placas de microtitulación (Greiner BioOne, Kremsmünster, Alemania) junto a un volumen idéntico del antimicrobiano diluido en el mismo caldo. Los antimicrobianos se prepararon y dispensaron previamente de izquierda a derecha en orden decreciente de concentración en las placas de microtitulación. El último pocillo de cada fila se empleó como control de crecimiento del microorganismo. La CMI se asignó a la concentración de antimicrobiano dispuesta en el primer pocillo donde no se detectó crecimiento del microorganismo tras la incubación de las placas de microtitulación en las condiciones referidas más bajo pocillo.

**E-test.** La suspensión estandarizada ( $10^8$  UFC/ml) del microorganismo fue sembrada sobre la superficie de placas de agar Mueller-Hinton empleando torundas de algodón. Transcurridos 10 minutos se depositó en el centro de la placa la tira comercial de E-test (bioMérieux). Tras la incubación de las placas, ver abajo, se asignó como valor de CMI a la concentración de antimicrobiano donde se situó la intersección entre el extremo de inhibición de la elipse y la tira de E-test.



### 3.3.2 Estudio comparativo de la sensibilidad de *S. maltophilia* a los antimicrobianos

La actividad de múltiples antimicrobianos (ver abajo) frente a *S. maltophilia* se valoró en la serie completa de microorganismos ( $n=124$ ) empleando el método de la dilución en agar ante la ausencia de recomendaciones específicas para el desarrollo de este tipo de pruebas en *S. maltophilia*. La CMI se determinó tras 24h y 48h de incubación de la prueba a una temperatura de 35°C en atmosfera convencional, lo que supuso una extensión del periodo de incubación con respecto a las 20-24 horas sugeridas por el CLSI (232) para este microorganismo. Las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 se emplearon como cepas control de la calidad del ensayo tal y como establece el CLSI.

### 3.3.3 Antimicrobianos

Se estudiaron un total de 44 antimicrobianos (tabla 4) incluyendo diferentes combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas; amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam, cefepima/ácido clavulánico, ticarcilina/ácido clavulánico y aztreonam/ácido clavulánico. Amoxicilina y ampicilina se combinaron en proporción 2:1, piperacilina con una concentración fija de 4 µg/ml de tazobactam, cefepima y ticarcilina con una concentración fija de 2 µg/ml de ácido clavulánico (concentración máxima alcanzada en suero humano con dosis habituales del inhibidor) y aztreonam se combinó con el ácido clavulánico en proporción 2:1 y empleando una concentración fija de inhibidor de 2 µg/ml. La sensibilidad a cotrimoxazol (trimetotrim/sulfametoxazol en proporción 1:19) se desarrolló en presencia de un suplemento de 0,1 UI de timidina fosforilasa (Sigma-Aldrich).

Se empleó polvo valorado de potencia conocida, que fue preparada a partir de los solventes y diluyentes recomendados por sus respectivos fabricantes. Las soluciones madre se almacenaron a -70°C su uso.

**Tabla 4.** Relación de antibacterianos empleados en este estudio

Betalactámicos	Quinolonas	Tetraciclinas	Aminoglucósidos	Miscelánea
Amoxicilina <sup>1</sup>	Ác. nalidíxico <sup>5</sup>	Tetraciclina <sup>5</sup>	Gentamicina <sup>5</sup>	Cloranfenicol <sup>5</sup>
Ampicilina <sup>2</sup>	Norfloxacin <sup>5</sup>	Doxicilina <sup>2</sup>	Amikacina <sup>5</sup>	Rifampicina <sup>5</sup>
Cefepima <sup>3</sup>	Ciprofloxacino <sup>3</sup>	Minociclina <sup>2</sup>	Tobramicina <sup>5</sup>	Fosfomicina <sup>5</sup>
Piperacilina <sup>2</sup>	Ofloxacino <sup>5</sup>	Tigeciclina <sup>2</sup>		Colistina <sup>5</sup>
Ticarcilina <sup>1</sup>	Levofloxacino <sup>8</sup>			Polimixina B <sup>5</sup>
Aztreonam <sup>3</sup>	Moxifloxacino <sup>3</sup>			Eritromicina <sup>4</sup>
Ceftazidima <sup>1</sup>	Gatifloxacino			Claritromicina <sup>4</sup>
Imipenem <sup>6</sup>	Trovafloracino <sup>2</sup>			Azitromicina <sup>2</sup>
Meropenem <sup>7</sup>	Clinafloxacino <sup>2</sup>			Cotrimoxazol <sup>5</sup>
Ác. clavulánico <sup>1</sup>	Gemifloxacino <sup>1</sup>			
Sulbactam <sup>2</sup>				
Tazobactam <sup>6</sup>				

<sup>1</sup>Glaxo Smith-Kline, Madrid, España; <sup>2</sup> Pfizer, Groton, NY, USA; <sup>3</sup> Bristol-Myers, Madrid, España; Bayer, Leverkusen, Alemania; <sup>4</sup> Abbott, Madrid, España; <sup>5</sup> Sigma-Aldrich, <sup>6</sup>Merck Sharpe Done, Madrid, España; <sup>7</sup>Astra-Zeneca, Madrid, España; <sup>8</sup>Sanofi, Paris, Francia. (Los antimicrobianos fueron cedidos por sus respectivas casas comerciales a excepción de los adquiridos a través de Sigma-Aldrich)

### 3.3.4 Análisis de la actividad antimicrobiana puntos de corte de sensibilidad microbiológica

La actividad de los antimicrobianos estudiados se expresó a través de las medidas poblacionales CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> (valor de CMI que inhibió al 50% y 90% respectivamente de las cepas estudiadas) y el porcentaje de aislados clínicos distribuidos en categorías de sensibilidad tras una incubación de la prueba de sensibilidad de 24h y de 48h.

La distribución de los aislados en las categorías de sensibilidad, sensible (S), sensibilidad intermedia (I) y resistente (R), se realizó aplicando los puntos de corte de sensibilidad microbiológica propuestos por el CLSI (232) o en su defecto los propuestos para especies no pertenecientes a *Enterobacteriaceae*, para los antimicrobianos estudiados. Los puntos de corte (en µg/ml) empleados para ticarcilina-ácido clavulánico (S≤16/2, I=32/2-64/2, R≥128/2), ceftazidima (S≤8, I=16, R≥32), levofloxacin (S≤2, I=4, R≥8), minociclina (S≤4, I=8, R≥16), cotrimoxazol (cotrimoxazol, S≤2/38, R≥4/76) y cloranfenicol (S≤8, I=16, R≥32) fueron los que recomienda el CLSI en *S. maltophilia*. En los casos de piperacilina y ticarcilina (S≤16, I=32-64, R≥128), piperacilina/tazobactam (S≤16/4, I=32/4-64/4, R≥128/4), ceftazidima, cefepima y aztreonam (S≤8, I=16, R≥32), imipenem y meropenem (S≤4, I=8, R≥16), norfloxacin (S≤4, I=8, R≥16), ciprofloxacino (S≤1, I=2, R≥4), ofloxacino y gatifloxacino (S≤2, I=4, R≥8), tetraciclina y doxiciclina (S≤4, I=8, R≥16), amikacina y tobramicina (S≤4, I=8, R≥16), gentamicina (S≤16, I=32, R≥64), colistina y polymixina B (S≤2, I=4, R≥8) se aplicaron los puntos de corte recomendados para especies no pertenecientes a *Enterobacteriaceae*. Sin otras especificaciones más concretas, los puntos de corte microbiológico empleados para ácido nalidíxico (S≤16, R≥32) y rifampicina (S≤1, I=2, R≥4) fueron los recomendados para enterobacterias y *Staphylococcus spp.*, respectivamente, para moxifloxacino, trovafloxacino, gemifloxacino y clinafloxacino los aplicados para ciprofloxacino (S≤1, I=2, R≥4), para fosfomicina (S≤32, I=64, R≥128) los establecidos por la MENSURA (Mesa Española para la Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos) y para tigeciclina los propuestos por la FDA, Food and Drug Administration, (S≤2, I=4, R≥8). Los puntos de corte utilizados para las combinaciones cefepima/ácido clavulánico y aztreonam/ácido clavulánico fueron los de cefepima y aztreonam.

El análisis de sensibilidad se realizó empleando la serie completa de aislados clínicos recopilados ( $n=124$ ) y las series de aislados clínicos resultantes tras la aplicación de criterios de selección de aislados clínicos demográficos y genotípicos. Los aislados clínicos seleccionados de acuerdo a criterios demográficos ( $n=108$ ) fueron aislados clínicos de la serie completa obtenidos de pacientes diferentes o en un mismo paciente si el origen clínico de la muestra fue diferente. Los aislados clínicos seleccionados de acuerdo a criterios genotípicos ( $n=106$ ) fueron aislados clínicos de la serie completa con un perfil de macrorestricción del ADN único. Con este criterio quedaron excluidos del análisis los aislados clínicos procedentes de transmisiones cruzadas entre pacientes o cepas repetidas de un mismo paciente con diferente origen clínico.

Las diferencias en la distribución de los aislados en las categorías de sensibilidad tras la incubación de la prueba durante un periodo de 24h o 48h se establecieron empleando el test de McNemar's. Las diferencias detectadas en la actividad de los antimicrobianos, las variaciones en la actividad en función del criterio de selección de los aislados clínicos o del origen clínico de la muestra se establecieron mediante el test de la chi-cuadrado ( $\chi^2$ ).

### **3.3.5 Influencia del método de sensibilidad y de las condiciones de incubación de la prueba en la actividad de las quinolonas**

La influencia del método y de las condiciones de incubación de la prueba en la sensibilidad de seis quinolonas, ácido nalidíxico, ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, gatifloxacino y clinafloxacino se valoró en 67 aislados clínicos de *S. maltophilia* genéticamente diferentes empleando simultáneamente el método de la dilución en agar y el método de la microdilución en caldo. Las pruebas se incubaron siguiendo las recomendaciones del CLSI, temperatura de 35°C, atmósfera de O<sub>2</sub> y un tiempo de incubación de 20-24h. La CMI se determinó tras un periodo de incubación de 20h., tras prolongar la incubación hasta las 24h. y hasta las 48h. De esta forma se obtuvieron un total de 3 lecturas de sensibilidad diferentes para cada quinolona y método de sensibilidad.

Dos aislados clínicos de *P. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* y las cepas de referencia de *A. baumannii* ATCC 19606, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922, fueron empleadas como controles del estudio.

La coincidencia en los resultados obtenidos con dos condiciones de incubación diferentes para un método en concreto se expresaron mediante el número de cepas con cambios la CMI para la condición modificada con respecto a las condiciones estándar, y el porcentaje de cambios en el valor de CMI de  $\pm 1$  dilución logarítmica.

Las discrepancias entre ambas condiciones se definieron de acuerdo a los criterios recogidos en el documento M23-A2 del CLSI donde se considera la presencia de un error grave de determinación cuando a partir del método de referencia se obtiene una falsa sensibilidad, un error mayor cuando se obtiene una falsa resistencia, y un error menor, cuando el resultado del método de referencia fue de sensibilidad intermedia y variable entre sensible o resistente mediante el método o variación propuesta (289). Dado que el número de errores menores detectados en el estudio fue muy elevado y su importancia es relativa en comparación con los anteriores, este criterio fue omitido con el motivo de facilitar el análisis de los resultados.

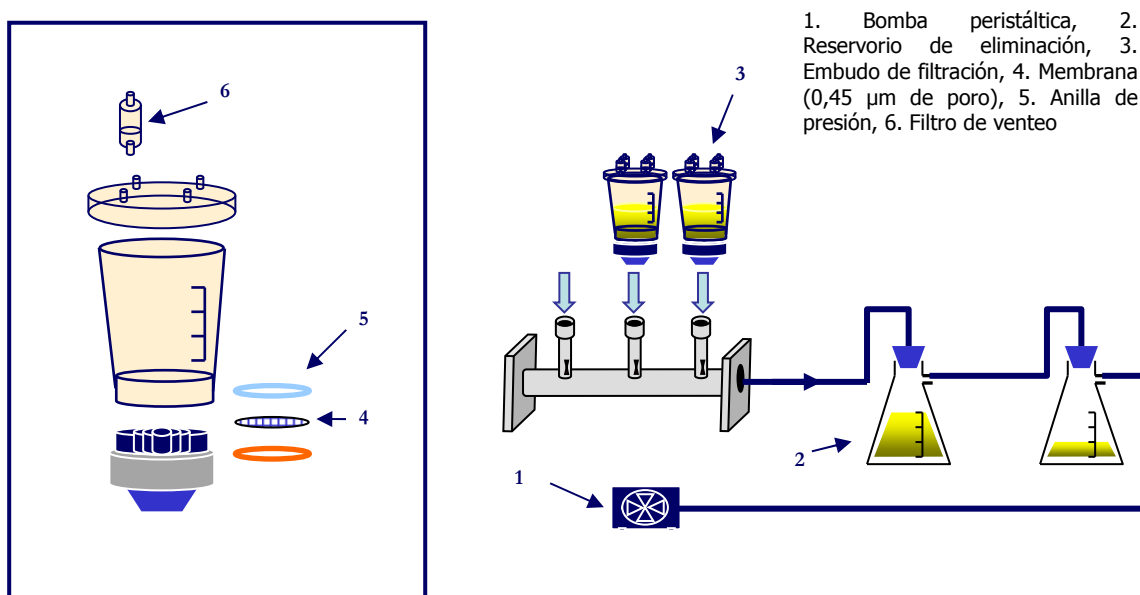
La influencia del tiempo de lectura en la distribución de la CMI se determinó empleando el test de McNemar. La comparación de la distribución de los aislados en categorías de sensibilidad entre métodos o temperaturas a un tiempo de lectura dado se realizó mediante el test de la chi-cuadrado. La correlación entre ambos métodos se estableció a partir del coeficiente de correlación de Spearman.

### 3.4 Farmacodinámica de las fluorquinolonas frente a *S. maltophilia* en un sistema *in vitro* de microfiltración

#### 3.4.1 Sistema

El sistema de microfiltración (252) (figura 11) es un sistema dinámico, no dilucional, en el cual la concentración de antimicrobiano es reemplazada progresivamente mediante filtración a intervalos regulares. La filtración facilita el intercambio de las diferentes concentraciones en el sistema y evita la pérdida de los microorganismos en suspensión. De esta forma el sistema permite imitar el curso de las concentraciones de antimicrobiano en un compartimento humano específico y valorar el efecto de la variación de las concentraciones sobre un microorganismo diana. La exactitud de la farmacocinética reproducida dependerá del número de intervalos que se acomoden al proceso.

El elemento principal del sistema es la unidad de filtración Sterifil® (Merck-Millipore, Billerica, MA). El sistema está constituido por múltiples unidades que se disponen en el interior de un agitador orbital y que ocasionalmente se conectan a un sistema de filtración a vacío para el intercambio de fluidos de la unidad. Cada unidad de filtración está formada por un embudo o cuerpo central, un cierre superior con puertos para la incorporación y extracción de fluidos y la aireación del medio y una base de soporte perforada sobre la que se colocan membranas de nitrocelulosa hidrófoba con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Advantec MFS, Pleasanton, CA) (figura 11). La escasa superficie filtrante y las características fisicoquímicas de la membrana de filtración, impiden, en ausencia de presión, la eliminación del contenido de la unidad y mantiene el volumen del sistema constante durante la simulación.



**Figura 11.** Representación esquemática de los dispositivos que componen el modelo de simulaciones mediante microfiltración

La simulación comienza incorporando en la unidad central el caldo de cultivo, la primera concentración de antimicrobiano y el microorganismo en estudio. A tiempos definidos, la base de la unidad central se conecta a la línea de vacío y mediante filtración (microfiltración) se elimina el contenido de la unidad. Los microorganismos en suspensión quedan retenidos en la membrana al presentar un tamaño superior al poro de la membrana. Posteriormente se incorpora caldo fresco junto con la nueva concentración de antimicrobiano en un volumen idéntico al eliminado, a través de los puertos situados en la parte superior del cuerpo central. El proceso se repite tantas veces como intervalos hayan sido acomodados teóricamente.

### 3.4.2 Microorganismos

Empleamos un total de 15 aislados clínicos de *S. maltophilia*, Sma9, Sma15, Sma18, Sma19, Sma22, Sma24, Sma27, Sma28, Sma46, Sma48, Sma51, Sma52, Sma71, Sma80 y Sma81 y la cepa de referencia de *S. maltophilia*, ATCC 13637 (SmaATCC). Esta selección se fundamentó en la sensibilidad a ciprofloxacino y en última instancia en la sensibilidad a cotrimoxazol y ticarcilina-ácido clavulánico. La selección evitó la inclusión de organismos repetidos.

### 3.4.3 Experimentos FC/FD

Empleando el sistema de microfiltración valoramos durante 24 horas el efecto antibacteriano de dosis únicas de 500 mg de levofloxacino, 400 mg de moxifloxacino y 400 mg de gatifloxacino administradas por vía oral frente a las cepas seleccionadas.

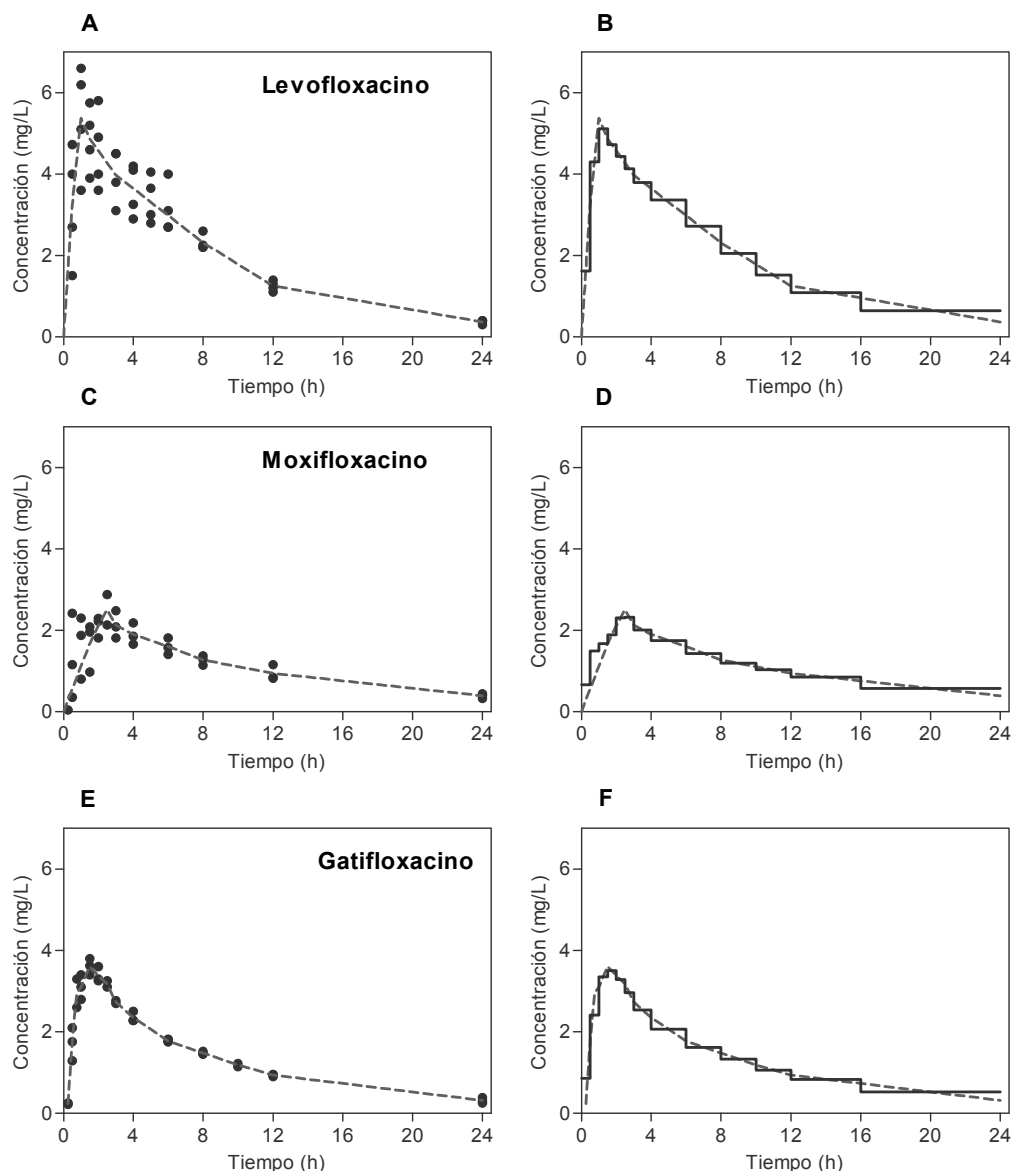
Para ello, colonias bien diferenciadas procedentes de un cultivo reciente en agar MHSS de cada una de las cepas fueron inoculadas en caldo MHSC e incubadas hasta obtener un cultivo en fase exponencial tardía ( $1 \times 10^8$  UFC/ml,  $A_{580}=0,06$ ). Volúmenes de 24 ml de este inóculo inicial fueron simultáneamente incorporados a 4 embudos de filtración, 1 para valorar una exposición nominal (control de crecimiento del microorganismo) y 3 para valorar la exposición del microorganismo a levofloxacino, moxifloxacino y gatifloxacino.

El descenso exponencial de concentraciones de levofloxacino, moxifloxacino y gatifloxacino en plasma humano fue reproducido con el sistema de microfiltración adaptando el curso normal de concentraciones a concentraciones fijas escalonadas, distribuidas a lo largo del periodo de dosificación.

Brevemente: Para cada antimicrobiano los datos concentración-tiempo procedentes de diferentes estudios farmacocinéticos fueron combinados y reevaluados mediante regresión no lineal empleando el programa Phoenix-WinNonlin 6.2 (Certara, Princeton, NJ). Las concentraciones plasmáticas observadas en los diferentes estudios, para levofloxacino (290-293), moxifloxacino (294-296) y gatifloxacino (297,298) así como el pronóstico del curso de concentraciones, de acuerdo a un modelo no compartimental (expresión 1)

$$C_p(t) = B \exp(-K_e t), \text{ expression 1}$$

donde  $C_p$  es la concentración en plasma a un tiempo  $t$ ,  $K_e$  es la constante de eliminación y  $B$  es el coeficiente del término exponencial) se describe en la figura 12 (A, C y E).



**Figura 12.** Farmacocinética en plasma de levofloxacino (A), moxifloxacino (C) y gatifloxacino (E) ajustada mediante el modelo no compartimental a partir de los datos obtenidos de estudios farmacocinéticos en humanos e intervalos de concentraciones extrapoladas desde el perfil de concentraciones pronosticado (B, D y F).

A partir de los parámetros farmacocinéticos generados y estimando  $B$  como la concentración máxima ( $C_{max}$ ) a un tiempo dado ( $T_{max}$ ), fueron calculadas las concentraciones correspondientes a los diferentes intervalos extrapolados (figura 12, B, D y F, tabla 5) de acuerdo a la siguiente expresión (expresión 2):

$$CI_n = C_p(t_a) + C_p(t_b)/2, \text{ expresión 2}$$

donde  $CI_n$  es la concentración media del intervalo definido entre  $t_a$  y  $t_b$  y  $C_p$  es la concentración plasmática a un tiempo dado.

Una vez incorporada la primera concentración de antimicrobiano, los embudos fueron mantenidos a 35°C en agitación constante de 75 r.p.m. A las 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 6, 8, 10, 12 y 16 horas, el contenido de los embudos fue eliminado asépticamente mediante filtración y reemplazado por un volumen idéntico de caldo fresco suplementado con la concentración de antimicrobiano correspondiente al nuevo intervalo. Los controles de crecimiento fueron filtrados a tiempos idénticos reemplazando el contenido por caldo fresco sin antimicrobiano.

A los tiempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas (antes del proceso de filtración) se obtuvieron muestras desde los embudos de filtración y se depositaron sobre un absorbente polimérico no iónico (Amberlite XAD-4, Sigma-Aldrich) para evitar el efecto de las concentraciones remanentes de antimicrobiano. Las muestras, una vez diluidas convenientemente en solución salina fría, fueron sembradas sobre placas de agar MHSS e incubadas durante 48h a 35°C para proceder al recuento de bacterias viables. El límite de detección de la técnica fue de 50 UFC. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

**Tabla 5.** Concentraciones intervalos de concentraciones reproducidos con el sistema de microfiltración

Intervalos de tiempo (h)	Concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	Levofloxacino	Moxifloxacino	Gatifloxacino
0-0,5	1,62	0,66	0,86
0,5-1	4,3	1,49	2,41
1-1,5	5,12	1,67	3,35
1,5-2	4,72	1,89	3,5
2-2,5	4,43	2,31	3,28
2,5-3	4,13	2,32	2,96
3-4	3,79	2,01	2,54
4-6	3,37	1,75	2,06
6-8	2,72	1,43	1,62
8-10	2,05	1,19	1,33
10-12	1,52	1,03	1,06
12-16	1,09	0,85	0,83
16-24	0,64	0,57	0,52

#### 3.4.4 Medidas del efecto antimicrobiano y análisis farmacodinámico

El efecto antibacteriano fue cuantificado mediante el cambio en el recuento de microorganismos viables en log UFC/ml entre los tiempos 0 y 24h ( $r_{24h}$ ), el porcentaje del inóculo inicial reducido a las 24 horas (RII), la reducción máxima detectada en log UFC/ml ( $r_{max}$ ), el tiempo para reducir el inóculo inicial en un 99,9% ( $T_{99,9\%}$ ), y el AUBKC (área bajo la curva de muerte bacteriana). El AUBKC se calculó mediante regla trapezoidal con el programa GraphPad Prism 5.0. (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) a partir del recuento de microorganismos viables en log UFC/ml ( $\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$ ) situado por encima del límite teórico de detección obtenido en cada uno de los puntos de muestreo. El AUBKC fue estandarizado para cada par cepa-antimicrobiano para compensar las diferencias en el inóculo inicial.

La relación entre los índices FC/FD, AUC/CMI,  $C_{\max}$ /CMI,  $T_{>CMI}$  calculados con la CMI de 24h o de 48h y el efecto antibacteriano en forma de  $r_{24h}$ , RII,  $r_{\max}$ ,  $T_{99,9\%}$  y AUBKC se estableció empleando modelos no lineales de dosis respuesta. De acuerdo al Criterio informativo de Akaike (299) (expresión 3),

$$CIA = nL_N (SS/n) + 2K, \text{ expresión 3}$$

donde  $n$  es el número de valores observados,  $K$  es el número de parámetros que se ajustan más uno (mejor ajuste con menor CIA) y los estadísticos, suma de cuadrados de los residuales, desviación estándar, intervalo de confianza y  $r^2$  (300), el ajuste más óptimo se obtuvo empleando modelos sigmoideos de efecto máximo.

### 3.4.5 Selección de medidas del efecto y estudio de la influencia del método en el ajuste dosis-respuesta

La medida del efecto antibacteriano apropiada para establecer relaciones FC/FD se investigó mediante:

- 1) La reproducibilidad de la medida del efecto en múltiples repeticiones del ensayo. Se expresó como la variación media de los casos disponibles a través del coeficiente de variación medio  $\%CV = \frac{\sum SD}{n} 100$  y los estadísticos derivados (196,209)
- 2) La regularidad del patrón de respuestas observado en función de los cambios del índice FC/FD
- 3) La sensibilidad de la medida de acuerdo a los cambios del índice FC/FD (269)
- 4) La correlación con el índice FC/FD (196).

La influencia del método de sensibilidad en el estudio FC/FD se valoró comparando el ajuste entre la medida del efecto antimicrobiano y los índices FC/FD calculados a partir de los valores de CMI determinados por los métodos de sensibilidad de la dilución en agar, microdilución en caldo y E-test y en condiciones de incubación diferentes

El método estándar se estableció de acuerdo a los parámetros del ajuste, criterios CIA y la suma de cuadrados de las distancias verticales de los puntos a la curva de regresión. La probabilidad relativa de dos métodos por ser el método más correcto empleado en el ajuste se estableció empleando la expresión 4

$$P_{\text{relativa}} = P_{\text{métodoA}} / P_{\text{métodoB}}, \text{ expresión 4}$$

donde las probabilidades del método A y B se calculan a partir de la expresión 5

$$P = \exp(-0,5\Delta/1) + \exp(-0,5\Delta), \text{ expresión 5}$$

y en donde  $\Delta$  es la diferencia entre los valores del criterio CIA obtenido del ajuste de ambos métodos  $\Delta CIA = CIA_B - CIA_A$  (301).



### 3.4.6 Análisis estadísticos

La comparación de los efectos antibacterianos entre niveles de se establecieron mediante el t-test, o mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con el test de Tukeys para establecer las comparaciones múltiples. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

### 3.4.7 Análisis de la población de *S. maltophilia* tras la exposición a dosis únicas de fluorquinolona

La aparición de resistencias en las poblaciones de *S. maltophilia* que fueron expuestas a dosis únicas de fluorquinolona, se valoró en paralelo al recuento de células viables inoculando las muestras recuperadas al tiempo 24 horas en placas de cultivo suplementadas con la fluorquinolona utilizada en el sistema *in vitro*. Brevemente; las muestras recuperadas del sistema y depositadas en el absorbente polimérico, fueron diluidas convenientemente y sembradas (límite de detección 50 UFC) en placas de agar suplementado con levofloxacino o moxifloxacino o gatifloxacino a concentraciones de 4, 8 y 16 veces la CMI (4xCMI, 8xCMI, 16xCMI) inicial del microorganismo. Tras un periodo de incubación de 48 horas, se procedió al recuento de colonias resistentes. La densidad de microorganismos presentes en las placas suplementadas con antimicrobiano se comparó con la densidad de células presente en las placas libres de antimicrobiano (0xCMI).

Colonias procedentes de las placas de cultivo libres de antimicrobiano y suplementadas con la máxima concentración de quinolona donde se detectó el crecimiento (una colonia por placa) fueron recuperadas, subcultivadas en tres ocasiones consecutivas sobre agar MHS libre de antibiótico y congeladas a  $-45^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Las cepas recuperadas de las placas suplementadas con quinolona fueron sometidas a restricción con *Xba*I y los perfiles de PFGE obtenidos comparados con el de sus respectivas cepas progenitoras. El perfil de sensibilidad de las cepas recuperadas a fluorquinolonas, tetraciclinas, aminoglucósidos, betalactámicos, cloranfenicol y cotrimoxazol, fue determinado empleando el método de la dilución en agar, tal y como describimos previamente en el apartado 3.3.1 y comparado con el de sus respectivas cepas progenitoras.

## 3.5 Caracterización de los mecanismos de resistencia responsables de la pérdida de sensibilidad a fluorquinolonas

### 3.5.1 Microorganismos

La identificación de los mecanismos de resistencia se llevó a cabo en 18 cepas recuperadas desde las placas de cultivo suplementadas con quinolona tras la exposición de las respectivas cepas progenitoras a levofloxacino o moxifloxacino. Dos de las cepas seleccionadas procedieron de placas de cultivo libres de antimicrobiano y se emplearon para demostrar que la selección de resistencias ocurrió durante la exposición y no durante el proceso de caracterización de la población en las placas de aislamiento. Las cepas progenitoras Sma9, Sma15, Sma19, Sm46,

Sma51, Sma52, Sma71 y Sma80 y las cepas salvajes Sma22 y Sma28 fueron utilizadas como controles de la expresión de los diferentes mecanismos de resistencia analizados.

### **3.5.2 Caracterización de la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) de *GyrA* y *ParC* en las cepas recuperadas tras la exposición a quinolonas**

Los cebadores empleados en la amplificación y secuenciación de los QRDRs de *gyrA* y *parC* fueron los descritos inicialmente por Valdezate y cols (97);

SMGYRA-F; 5'-AACTCAACGCGCACAGCAACAAGCC-3',

SMGYRA-R; 5'-CCAGTTCCTTTTCGTCGTAGTTGGG-3', (Genbank, número de acceso AJ409325),

SMPARC-F; 5'-ATCGGCGACGGCCTGAAGCC-3',

SMPARC-R; 5'-CGGGATTTCGGTATAACGCAT-3' (GenBank número de acceso AJ409327)

La amplificación del ADN se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), a partir de 5 µl de molde de ADN en un volumen final de 50 µl que contenía, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, desoxinucleótidos trifosfatos (200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP, 200 µM dTTP-Bitools, Jupiter, FL), 2,5 pM de cada cebador y 5,0 U de *Taq* polimerasa (Eppendorf). El ADN molde fue obtenido mediante ebullición (10 min) y posterior centrifugación (12.000 rpm, 10min) de una suspensión de microorganismo en agua ultrapura ( $A_{600}$ = 0,3-0,4). La reacción de amplificación consistió en una desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, 30 ciclos de amplificación (1 min a 94°C, 1 min. a 54°C para el anillamiento y 1 min. a 72°C para la polimerización) y un ciclo final de 5 minutos a 72°C para la extensión completa de los amplicones. Los productos amplificados fueron incorporados a geles de agarosa (BioRad) y sometidos a electroforesis durante 90 minutos a 120 voltios. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (1 µg/ml) y visualizados en un transiluminador digital (GelDoc 2000 System, BioRad). El tamaño de los fragmentos generados, 300 bp para *gyrA* y 273 bp para *parC* fue interpretado y confirmado con un marcador de peso molecular de 100 bp (NZYtech, Lisboa, Portugal).

Los productos de PCR fueron purificados (Quiagen, Hilden, Alemania) y posteriormente secuenciados (ambas cadenas de ADN) empleando los cebadores descritos anteriormente con el big dye terminator cycle sequencing kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Los productos fueron analizados mediante el secuenciador ABI PRISM® 377 DNA Sequencer (Thermo Fisher Scientific). El análisis de la secuencia nucleotídica, y su posterior traducción a secuencia aminoacídica se realizó con el software PCGene.

### **3.5.3 Caracterización de los patrones de expresión de los sistemas de expulsión multidroga *SmeABC* y *SmeDEF* PCR de transcripción inversa (RT-PCR)**

El análisis de los patrones de expresión de los operones *smeDEF* y *smeABC* se realizó mediante PCR de transcripción inversa empleando los cebadores previamente descritos para *smeD* y *smeF* por Alonso y cols (65), SMDEFD-F (5'-CCAAGAGCCTTCCGTCAT-3') y SMDEFD-R (5'-

TCTCGGACTTCAGCGTGAC-3'), SMDEFF-F (5'-TGACGAATTCTGGTCCGTGAAG AACGACAA-3') y SMDEFF-R (5'-AGCGTCTAGATGGCGGCAATGGAGAGAAC-3'), GenBank numero de acceso AJ252200 y para *smeA* por Li y cols (67) SMABCA-F (5'-TACAGAATTCATG TCTCTCCTGCGCCG-3') y SMABC-R (5'-ACCTTAACCTGTGCCTTG-3')], GenBank, número de acceso AF173226.

A partir de un cultivo de 24 horas en agar MHSS, se preparó una suspensión en caldo MHSC, que fue incubada hasta alcanzar una densidad óptica equivalente a  $10^7$  ufc/ml ( $A_{580}=0,06$ ). El ARN bacteriano, de 1 ml de la suspensión en fase estacionaria, fue extraído empleando el sistema comercial Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen). Tras el tratamiento con ADNasa libre de ARNasa (2U de enzima/gramo de ARN, durante 60 min. a 37°C, Qiagen) para el eliminar el ADN residual, el ARN fue repurificado empleando el mismo kit comercial. La concentración y pureza del ARN fue estimada mediante espectrofotometría a  $A_{260}$  y  $A_{280}$  nm (Sambrook, 1989) empleando un biofotómetro (Eppendorf). Muestras de 0,02 µg del ARN tratado con la DNasa fueron empleadas de molde en la PCR de transcripción inversa con el sistema comercial Quiagen OneStep RT-PCR (Quiagen) de acuerdo al protocolo suministrado por el fabricante. Se emplearon treinta µmoles de cada cebador por reacción (volumen final de 50 µl). La reacción de amplificación consistió en una incubación de 30 min. a 50°C, seguida de 15 min. a 95°C y de 45 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 55°C y 60 seg. a 72°C. La extensión de los amplicones se completó con un ciclo de 10 minutos a 72°C. Un volumen de 15 µl de muestra de cada producto de reacción fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% confirmando los tamaños de bandas estimados de 140 bp para *smeD*, 917 para *smeF* y 742 para *smeA*. Todas las muestras de ARN incluyeron un control positivo, detección de ADN contaminante mediante PCR a partir de 0,5 g de ARN y un control negativo, donde se sustituyó al ARN molde, por agua ultrapura en la mezcla de reacción.

#### **3.5.4 Estudio del efecto de los inhibidores de amplio espectro de las bombas de expulsión, reserpina y L-fenilalanina-L-arginina-β-naftilamida en la resistencia de *S. maltophilia* a los antimicrobianos**

El efecto de reserpina (Sigma-Aldrich) y Phe-Arg-β-naftilamida, PAβN (MC 207.110, Sigma-Aldrich) en la resistencia de *S. maltophilia* fue analizado comparando la CMI de ácido nalidíxico, levofloxacino, moxifloxacino, tetraciclina y cloranfenicol en ausencia o presencia de cada inhibidor, en aislados clínicos de *S. maltophilia* no relacionados genéticamente (n=106) y en las cepas resistentes recuperadas del sistema *in vitro* (n=18). La CMI se determinó mediante el método de la dilución en agar tras una incubación de 48 horas. Reserpina se combinó a concentraciones de 25 µg/ml (98) y PAβN a concentraciones de 40 µg/ml (188). Los resultados se expresaron como la moda de tres repeticiones en días diferentes.

### **3.6 Optimización de dosis de moxifloxacin en el tratamiento de las infecciones por *S. maltophilia***

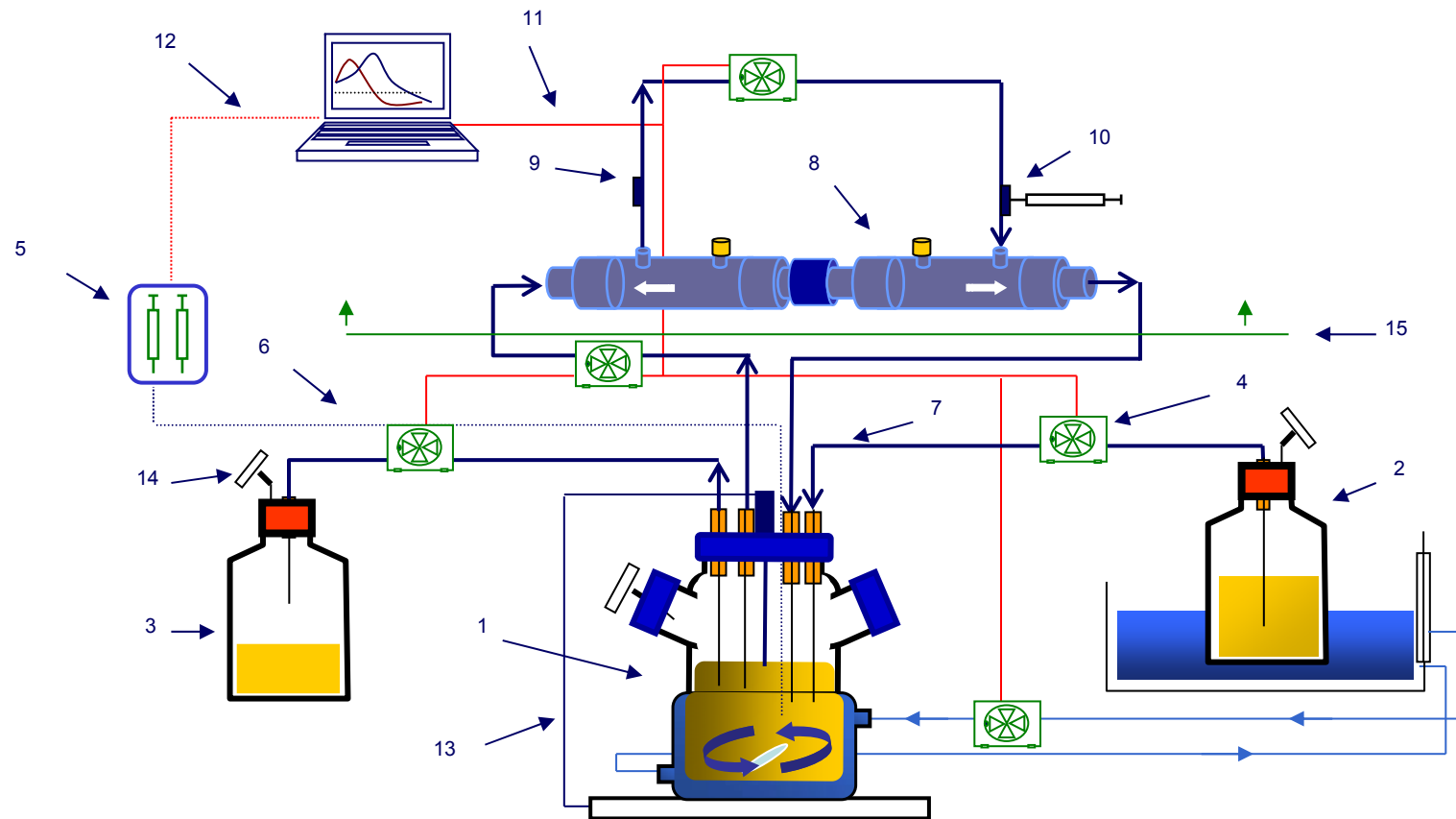
#### **3.6.1 Sistema continuo de dos compartimentos**

El sistema (figura 13-14) deriva del originalmente descrito por Blaser y cols en 1985 con importantes modificaciones (261). El sistema reproduce el descenso mono-exponencial de las concentraciones de antimicrobiano en unidades capilares artificiales de acuerdo a la vida media de eliminación en humanos y expone la fluctuación de concentraciones al microorganismo en estudio.

Está dividido en cuatro secciones diferenciadas y conectadas entre sí por medio de tuberías de silicona (Thermo Fisher Scientific). La pieza central del sistema es un frasco de doble camisa (Bellco Glass, Vineland, NJ) de capacidad variable que alberga de 8-10 puertos abiertos al exterior adaptados para la conexión de tuberías y sondas de medición y el sistema de agitación (una varilla de teflón que envuelve en su extremo un imán). El frasco central se sitúa sobre un agitador calefactor magnético que controla la homogeneización del contenido y la temperatura del proceso. La circulación de agua a temperatura de 37°C a través de la doble camisa del frasco central evita pérdidas de calor y picos de temperatura. El equipo se completa con el frasco reservorio del medio de cultivo, situado en el interior de un baño de agua a una temperatura constante de 37°C, el frasco de eliminación de residuos y el dispositivo donde se ubica el segundo compartimento, compartimento periférico o compartimento de infección. En este caso el dispositivo está formado por capsulas de microfiltración (Fiber Flo, Thermo Fisher Scientific). Las cápsulas de microfiltración son estructuras constituidas por una carcasa externa y un haz de cientos de fibras huecas de superficie porosa (0,2 µm de tamaño de poro) que recorren toda su longitud. El haz se sella a la carcasa en un único extremo por lo que las fibras dibujan un recorrido de ida y vuelta a lo largo de la cápsula. De esta forma se consigue un conducto hueco con una elevada superficie filtrante (550 cm<sup>2</sup>) que da continuidad a la tubería procedente del frasco central. Al conectar otra cápsula en sentido inverso se consigue un espacio extracapilar delimitado por la superficie externa de la fibra y la carcasa del dispositivo donde se confina el microorganismo. Los puertos de la cápsula próximos al extremo sellado conectan el espacio extracapilar al exterior. Ambos puertos se conectan mediante una tubería extracapsular. Esta tubería extracapsular se interrumpe en dos puntos del recorrido con llaves de tres vías desechables que hacen las veces de puerto de inoculación del sistema y de puerto de muestreo para la monitorización del curso de concentraciones del antimicrobiano y de la actividad frente al microorganismo. Ambas partes, capsulas y tubería extracapsular se mantienen en el interior de una estufa a una temperatura constante de 35°C.

El compartimento central del sistema es un compartimento exclusivamente farmacocinético y está representado por el frasco central, las tuberías que conectan el frasco central con el segundo dispositivo y el interior de las fibras huecas de las capsulas de microfiltración.

.



**Figura 13.** Esquema del sistema farmacodinámico de dos compartimentos

1. Frasco central de doble camisa), 2. Reservorio con caldo fresco, 3. Eliminación, 4. Bombas peristálticas, 5. Bomba de inyección, 6. Tubería PTFE, 7. Tubería de silicona, 8. Compartimento periférico (capsulas de fibra hueca), 9. Puerto de inoculación, 10. Puerto de muestreo, 11. Red RS-232, 12. Red GSIOC, 13. Sonda de temperatura conectada a baño termostatzado, 14. Filtros de aire y 15. Incubador.



**Figura 14.** Sistema farmacodinámico *in vitro* de dos compartimentos. Imagen izquierda, detalle del compartimento central. Imagen derecha, módulo farmacocinético (exterior de la estufa), módulo farmacodinámico (interior de la estufa). En este caso el dispositivo periférico es un cartucho de diálisis.

El segundo compartimento es un compartimento farmacocinético-farmacodinámico y está representado por el espacio extracapilar de las cápsulas y el interior de la tubería extracapsular. El sistema dispone de dos redes de transmisión de datos independientes, GSIOC y RS-232, que dotan a todas las bombas, peristálticas o de inyección de soporte informático. Los caudales son controlados en las bombas y monitorizados empleando el programa WinLin (Thermo Fisher Scientific).

### 3.6.2 Proceso farmacocinético

La dosificación del antimicrobiano se realiza directamente en el frasco central mediante una bomba de inyección (mod. 402 Dilutor Dispenser, Gilson, Middleton, WI). La bomba de inyección se programa a un flujo y volumen adecuado para alcanzar la concentración máxima ( $C_{max}$ ) en un tiempo característico ( $T_{max}$ ). El descenso mono- o poli-exponencial de concentraciones de antimicrobiano en el compartimento central y de infección se consigue mediante un proceso continuo de dilución del antimicrobiano y eliminación de la mezcla desde el frasco central empleando bombas peristálticas (Thermo Fisher Scientific). Bombas similares bombean el contenido del frasco central hacia el dispositivo de infección a un flujo constante de 6 ml/min, atraviesa la fibra hueca de la primera capsula, accede al espacio extracapilar y regresa a través de la fibra hueca de la segunda capsula al frasco central a favor de presión. Desde el frasco central se bombea el contenido hacia el frasco de eliminación manteniendo el volumen del sistema constante.

Las bombas peristálticas situadas entre el frasco reservorio y el frasco central y entre este y el frasco de eliminación se programan para circular a un flujo que permita simular la vida media del antimicrobiano de acuerdo al volumen de distribución del sistema.

### 3.6.3 Ecuaciones para el cálculo de parámetros del sistema *in vitro*

El aclaramiento (Cl) programado en las bombas peristálticas principales, se calcula empleando una aproximación no compartimental a partir de la vida media de eliminación del antimicrobiano ( $t_{1/2}$ ) y el volumen del sistema *in vitro* ( $V_s$ ) del sistema (expresión 6 y 7).

$$K_e = Cl/V_s, \text{ expresión 6}$$

$$t_{1/2} = \ln 2 / K_e, \text{ expresión 7}$$

Igualando ambas expresiones se obtiene la expresión general 8, donde el aclaramiento depende exclusivamente del  $V_s$  y la  $t_{1/2}$

$$Cl = V_s \cdot \ln 2 / t_{1/2}, \text{ expresión 8}$$

En administraciones orales, la concentración máxima o  $C_{max}$ , depende de la dosis administrada, la fracción absorbida y las constantes de absorción y eliminación-distribución del fármaco. Dado que el curso temporal de las concentraciones simuladas, puede ser descrito mediante la ecuación de primer orden correspondiente a una administración extravascular de un modelo

cinético mono-compartimental (expresión 9) donde A y B serán los coeficientes del término exponencial y la  $K_a$  la constante de absorción,

$$C_p = B \exp(-K_a t) - A \exp(-K_e t), \text{ expresión 9}$$

es posible determinar la dosis necesaria para obtener la  $C_{\max}$  diana. Así partiendo de la expresión 9, y considerando un proceso de absorción total (fracción de absorción igual a 1), la dosis a administrar quedaría definida por la expresión 10 donde D es la dosis,  $C_{\max}$  es la concentración máxima y  $K_a$  es la constante de absorción.

$$D = C_{\max} V_d / (K_a / K_e)^{K_e / (K_e - K_a)}, \text{ expresión 10}$$

Dado que la expresión 11 permite calcular el tiempo en el que se alcanza la  $C_{\max}$ ,

$$T_{\max} = 2.303 / K_a - K_e \log K_a / K_e, \text{ expresión 11}$$

Despejando la  $K_a$  e igualando ambas expresiones 10 y 11 se consigue la ecuación general que establece la dosis a administrar en un tiempo dado para conseguir los niveles máximos diana en el tiempo máximo diana.

### 3.6.4 Microorganismos

En el estudio de optimización de la terapia con moxifloxacino se emplearon 8 cepas de *S. maltophilia* de diferente sensibilidad a moxifloxacino. Seis de las cepas (Sma22, Sma18, Sma51, Sma80, Sma19, Sma9) fueron aislados clínicos, genéticamente diferentes, con valores de CMI de entre 0,03-2 µg/ml. Las dos cepas restantes (Sma19M y Sma80M2) fueron cepas de laboratorio obtenidas tras la exposición de las cepas Sma19 y Sma80 a una dosis de 400 mg de moxifloxacino en el sistema de microfiltración. Ambas cepas presentaron valores de CMI a moxifloxacino de 4 y 8 µg/ml respectivamente.

### 3.6.5 Concentración preventiva de mutantes

La concentración preventiva de mutantes (CPM), fue determinada de acuerdo al método inicialmente descrito por Zhao y cols. (284) Para ello entre tres y cuatro colonias procedentes de un cultivo reciente en agar MHSS fueron inoculadas en 200 ml de caldo HHS e incubados durante 12 horas. La suspensión resultante se centrifugó (a 4000 xg durante 10 min) en dos ocasiones y se incorporó a 4 ml de caldo MHS obteniendo una concentración aproximada de  $10^{11}$  UFC/ml. Series de placas de agar que contenían una concentración conocida de moxifloxacino (diluciones dobles seriadas y con una diferencia de 1 µg/ml), fueron inoculadas con 100 µl del inóculo precedente (densidad final en palca de  $10^{10}$  UFC/ml). Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h antes de proceder al recuento de microorganismos viables. La CPM fue estimada mediante regresión lineal a partir de la ecuación de la recta que describe la relación entre el recuento de microorganismos viables (log UFC/placa) y la concentración de



moxifloxacino. La concentración mínima que inhibe por completo el crecimiento bacteriano o CPM, fue definida como el punto de la recta de regresión que intercepta al eje X (235).

### 3.6.6 Experimentos FC/FD

El sistema descrito fue seleccionado para valorar el efecto del escalamiento de dosis de moxifloxacino, dosis de 200 mg , 400 mg y 800 mg administrados cada 24 horas o su fraccionamiento, dosis de 400 mg administrada cada 12 horas durante un periodo de tiempo de 24 horas. Los parámetros farmacocinéticos diana,  $C_{max}$  y  $T_{max}$  empleados para reproducir los perfiles de concentraciones en suero de humanos para la dosis oral de moxifloxacino 400 mg cada 12 horas fueron  $C_{max}$ ; 2,9 µg/ml y  $T_{max}$ ; 2 horas (302,303),  $C_{max}$ ; 1,16 µg/ml,  $T_{max}$ ; 2 horas para la dosis de 200 mg (294) y  $C_{max}$ ; 4,73 µg/ml y  $T_{max}$ ; 2,5 horas, para la dosis de 800 mg (294). La semivida de eliminación ( $t_{1/2}$ ) buscada con el sistema *in vitro* fue de 12,5 horas para todos los regímenes ensayados (294,296).

En un segundo bloque de experimentos se combinaron las dosis orales de 400 y 800 mg de moxifloxacino con el inhibidor de amplio espectro de las bombas de expulsión PAβN. El inhibidor fue administrado *in bolus* directamente en el compartimento central del sistema *in vitro* tomando como valores diana una  $C_{max}$  de 40 µg/ml (188) y un descenso mono-exponencial de las concentraciones de acuerdo una  $t_{1/2}$  de 12,5 horas (vida media de eliminación programada para moxifloxacino).

### 3.6.7 Niveles de antimicrobiano reproducidos *in vitro*

Para determinar las concentraciones simuladas de moxifloxacino se extrajeron muestras de 500 µl de ambos compartimentos a los tiempos 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 6, 8, y 24 horas y a los tiempos adicionales de, 12, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 16, 18, 20, 22 y 24 horas, cuando se trató de la dosificación administrada cada 12 horas. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento de su análisis.

Las concentraciones se determinaron mediante ensayo microbiológico en dos dimensiones empleando a la cepa de *E. coli* NCTC10480 como microorganismo indicador. Una suspensión de este microorganismo ajustada a  $10^8$  UFC/ml se sembró en masa en agar Mueller-Hinton atemperado a 45°C y se depositó en placas de Petri estériles de 15 cm de diámetro. Las placas se dejaron a temperatura ambiente y posteriormente con un sacabocados estéril se perforaron pocillos de 6 mm de diámetro. Los pocillos se inocularon con un volumen de 125 µl de la muestra problema o de las concentraciones estándar (rango 0,06-8 µg/ml) o del control interno (5 µg/ml). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h, antes de proceder a la lectura de los halos de inhibición. Todos los bioensayos fueron realizados en triplicado en días diferentes. Las pruebas farmacocinéticas se realizaron en al menos tres ocasiones, para cada régimen terapéutico.

Los niveles de PAβN se estimaron mediante bioensayo indirecto empleando a moxifloxacino como antimicrobiano indicador. Para ello moxifloxacino fue administrado *in bolus* de acuerdo a

los parámetros diana del inhibidor y la vida media de eliminación de moxifloxacino. Las muestras de los tiempos referidos anteriormente fueron procesadas mediante bioensayo con la cepa *E. coli*/NCTC10480 y los niveles obtenidos extrapolados a la cinética del inhibidor.

Los parámetros farmacocinéticos correspondientes a los regímenes simulados con el sistema farmacodinámico, fueron calculados empleando el programa Phoenix-WinNonlin (Certara), mediante aproximaciones no compartimentales. La  $C_{\max}$  y el  $T_{\max}$  fueron obtenidos directamente a partir de los datos observados. La constante aparente de eliminación ( $K_e$ ) fue calculada mediante regresión lineal, para al menos tres pares de puntos tiempo-concentración procedentes de la fase terminal de la curva. La vida media de eliminación se calculó de acuerdo a la expresión  $\ln 2/K_e$ . El  $AUC_{\text{tot}}$  ( $AUC_{0-24}$ ), área bajo la curva concentración-tiempo desde el tiempo 0 hasta la última concentración observada ( $C_{\text{fin}}$ ), fue calculado mediante la regla trapezoidal lineal. El  $AUC_{\text{inf,obs}}$  se expresó mediante el  $AUC_{\text{tot}}$ , más  $C_{\text{fin}}/K_e$ .

### **3.6.8 Proceso farmacodinámico: Curvas bacterianas experimentales y selección de subpoblaciones resistentes**

Colonias bien diferenciadas procedentes de un cultivo de 18-24 horas en agar MHSS fueron seleccionadas y suspendidas en un volumen de 40 ml de caldo MHS. La solución resultante fue incubada a 37°C y monitorizada mediante espectrofotometría hasta conseguir una densidad óptica equivalente a una concentración final de  $2 \times 10^7$ -  $3 \times 10^7$  UFC/ml ( $A_{580} = 0,050$ - $0,058$ ). Un volumen de 35 ml de este inóculo inicial en fase exponencial fue incorporado al compartimento periférico del sistema *in vitro* a través del puerto de inoculación. El microorganismo se mantuvo en agitación y a una temperatura constante de 37°C durante al menos 15 minutos antes de comenzar la simulación. A los tiempos 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas se tomaron muestras desde el puerto de extracción del compartimento periférico para la determinación de microorganismos viables. Para evitar el efecto de las concentraciones remanentes de antimicrobiano un volumen de 500 µl de cada una de las muestras fue transferido directamente a tubos estériles que contenían 1 g de resina absorbente polimérica no iónica (Amberlite XAD-4). Las muestras se diluyeron convenientemente en solución salina fría (intervalo de 1:10 a 1:10.000 veces) y 20 µl de cada dilución o 50 µl de la muestra sin diluir (cuando se estimó necesario) se sembraron por duplicado en agar MHSS. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C antes de proceder al recuento de microorganismos viables. El límite de detección fue de 20 UFC.

Para valorar el efecto de cada régimen de tratamiento *in vitro* en la selección de subpoblaciones resistentes a moxifloxacino, un volumen de 100 µl de las muestras (diluidas o no) procedentes de los tiempos 0 y 24 horas fueron sembradas en paralelo sobre placas de agar MHSS suplementadas con concentraciones de moxifloxacino comprendidas dentro del rango de 1x a 16x CMI de la cepa en estudio. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C antes de proceder al recuento de microorganismos viables. Las colonias crecidas en las placas suplementadas fueron seleccionadas y tras tres pases consecutivos en medio libre de

antimicrobiano fueron congeladas hasta su uso. El límite de detección fue de 10 UFC. Cada modelo experimental se realizó en al menos tres ocasiones.

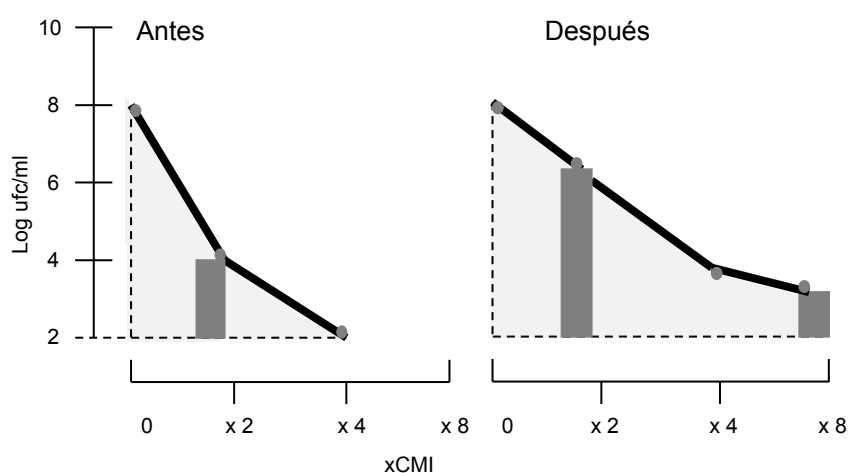
### 3.6.9 Medidas de efecto antibacteriano y de la selección de subpoblaciones resistentes a moxifloxacino

El efecto antibacteriano de moxifloxacino fue cuantificado mediante las medidas del efecto antibacteriano  $r_{24h}$ , RII,  $r_{max}$ ,  $T_{99,9\%}$  y las medidas intergradadas AUBKC y AUGC (área bajo la curva de crecimiento 0-24 horas). Ambas fueron calculadas con el programa GraphPad Prism 5.0. (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) a partir del recuento de microorganismos viables en log ufc/ml ( $\mu g/ml \cdot h$ ) situado por encima del límite teórico de detección. El AUBKC y el AUGC fueron estandarizados para compensar las diferencias en el inoculo inicial.

La amplificación o supresión de subpoblaciones resistentes fue valorada a través del recuento de microorganismos viables (log UFC/ml) en las placas suplementadas con 1x-16xCMI de moxifloxacino y el área bajo la curva del perfil del análisis de distribución de cada población (AUC-PAP) antes (tiempo 0) y después (tiempo 24 horas) de la exposición al antimicrobiano.

Brevemente:

El perfil del análisis de distribución de la población o perfil del análisis de la población (PAP) es el trazado teórico del número de microorganismos (en log UFC/ml) presente en cada subpoblación aislada en las placas suplementadas frente a la concentración, antes de la exposición ( $PAP_i$ ) y después de la exposición ( $PAP_f$ ) del antimicrobiano en el sistema in vitro (figura 15).



**Figura 15.** Trazado teórico del PAP. Las barras verticales representan el recuento de microorganismos viables a las concentraciones de antimicrobiano señaladas. El trazado representa el perfil del análisis poblacional. El gris el AUC-PAP (215).

El área bajo la curva contenido en el trazado del PAP se calculó mediante regla trapezoidal con el programa GraphPad Prism 5.0, aplicando un límite basal de 1-log UFC/ml. Este AUC-PAP es una medida resumida de la distribución de las subpoblaciones resistentes presentes en la

población que es muy sensible a las variaciones en la extensión de la resistencia (concentración supra-inhibitoria máxima donde se detecta una subpoblación). Cuanto mayor es el valor que adopta el AUC-PAP, más heterogénea es la población estudiada.

Como medidas de la amplificación o supresión de la resistencia se emplearon el cambio en el recuento de viables en las placas suplementadas con moxifloxacino a 2x-16xCMI antes ( $N_i$ ) y después ( $N_f$ ) de la exposición ( $N_f/N_i$  2x,  $N_f/N_i$  4x,  $N_f/N_i$  8x y  $N_f/N_i$  16x, y el cambio del AUC-PAP antes (AUC-PAP<sub>i</sub>) y después (AUC-PAP<sub>f</sub>) de la exposición de moxifloxacino.

### **3.6.10 Análisis del efecto antibacteriano**

La influencia de la dosis, el valor de CMI y la presencia del inhibidor PA $\beta$ N de forma individual o combinada, en el efecto antimicrobiano de moxifloxacino fue valorada empleando un modelo lineal de efecto mixto (LinMix) con el programa Phoenix- WinNonlin (Certara). El modelo de efectos LinMix es un sistema de análisis factorial de la varianza útil en estudios cruzados y paralelos o incluso en estudios con diseños no balanceados como el presentado (las dosis expuestas no fueron las mismas en todas las cepas y no todas las dosis se combinaron con el inhibidor). Las hipótesis nulas rechazadas para los factores principales analizados fueron contrastadas empleando las comparaciones múltiples mediante el test de Tukeys una vez asumidas varianzas iguales. La interpretación de las interacciones entre factores se realizó a través del modelado de los gráficos de perfil. La asunción contenida en el gráfico fue más tarde confirmada mediante el ajuste para comparaciones múltiples de Bonferrini.

### **3.6.11 Análisis de regresión múltiple. Identificación del índice FC/FD dominante**

La contribución individual de cada uno de los índices FC/FD AUC/CMI,  $C_{max}/CMI$  y  $T_{>CMI}$ , en la obtención del efecto antibacteriano desarrollado por moxifloxacino en *S. maltophilia*, se valoró mediante regresión lineal múltiple empleando los métodos de selección de variables hacia delante y hacia atrás. El logAUC/CMI, log $C_{max}/CMI$  o el  $T_{>CMI}$  fueron empleadas como variables dependientes y la medida del efecto antibacteriano como variable independiente. La relación lineal que guardaron entre si las tres variables dependientes fue valorada a través del coeficiente de correlación de Spearman.

En el análisis la ponderación fue proporcional al número de experimentos replicados y a la variabilidad entre repeticiones. Los modelos fueron comparados usando el estadístico t y la  $r^2$  del modelo. Las estimaciones obtenidas en esta primera aproximación fueron comparadas con las estimaciones procedentes de un subgrupo de datos más reducido donde la relación lineal entre las tres variables farmacodinámicas fue más reducida.

### **3.6.12 Análisis FC/FD del efecto de moxifloxacino en la población total**

La relación entre la exposición de moxifloxacino y la respuesta antibacteriana fue descrita mediante la ecuación de Hill (WinNonlin). Debido a que las respuestas en diferentes cepas con exposiciones similares fueron superponibles, todas las cepas fueron incluidas en único análisis. De acuerdo al Criterio informativo de Akaike (CIA) y y el estadístico  $r^2$ , el modelo inhibitorio

sigmoidal (expresión 12) describió más adecuadamente la relación entre la dosis expuesta, expresada como el AUC/CMI, AUC/CPM, C<sub>max</sub>/CMI, C<sub>max</sub>/CPM o T<sub>>CMI</sub>, y T<sub>>CPM</sub> y el efecto antibacteriano.

$$\text{Efecto} = E_{\max} - (E_{\max} - E_0) * (C^h / C^h + EC_{50}^h), \text{ expresión 12}$$

donde E<sub>max</sub> es la respuesta máxima (mínimo efecto antimicrobiano), E<sub>0</sub> es la respuesta basal (límite de detección de la medida de efecto antimicrobiano), EC<sub>50</sub> es la magnitud de la dosis expresada en forma de cociente AUC/CMI, AUC/CPM, C<sub>max</sub>/CMI, C<sub>max</sub>/CPM, T<sub>>CMI</sub>, T<sub>>CMI</sub> o T<sub>>CPM</sub> que ocasiona el 50% del efecto máximo y *h* es la constante de sigmoicidad de Hill.

La magnitud que originó el 80% del efecto máximo, EC<sub>80</sub>, se determinó a partir de la siguiente expresión (expresión 13)

$$\text{Log}_{10}EC_{50} = \text{Log}_{10}EC_f - (1/h) * \text{Log}_{10} (f/(100-f)), \text{ expression 13}$$

donde EC<sub>f</sub> es la magnitud que origina un porcentaje de efecto *f*

### **3.6.13 Análisis FC/FD del efecto de moxifloxacin en las subpoblaciones resistentes**

La relación entre los índices FC/FD, AUC/CMI o AUC/CPM con la selección de resistencias se estableció empleando ecuaciones de tipo Gauss (expresión 14) a partir de las relaciones normalizadas N<sub>f</sub>/N<sub>i</sub> a 2xCMI, N<sub>f</sub>/N<sub>i</sub> a 4xCMI, N<sub>f</sub>/N<sub>i</sub> a 8xCMI, N<sub>f</sub>/N<sub>i</sub> a 16xCMI y la relación AUC-PAP<sub>f</sub>/AUC-PAP<sub>i</sub>.

$$Y = a \exp[-0,5 ((x-x_c)/b)^2], \text{ expresión 14}$$

donde Y es el cociente AUC-PAP<sub>f</sub>/AUC-PAP<sub>i</sub> o *f<sub>f</sub>/f<sub>i</sub>*, *x* es el Log<sub>10</sub> del índice FC/FD, *x<sub>c</sub>* es el Log<sub>10</sub> del índice FC/FD cociente AUC/CMI, AUC/CPM, C<sub>max</sub>/CMI, C<sub>max</sub>/CPM, T<sub>>CMI</sub>, T<sub>>CMI</sub> o T<sub>>CPM</sub> que se corresponde con el máximo cociente AUC-PAP<sub>f</sub>/AUC-PAP<sub>i</sub> o *f<sub>f</sub>/f<sub>i</sub>*, y *a* y *b* son los parámetros de la ecuación.

La relación entre la aparición de resistencias en forma de AUC-PAP<sub>f</sub>/AUC-PAP<sub>i</sub> y el tiempo que las concentraciones se situaron dentro de la ventana de selección de mutaciones (VSM) fue descrita mediante la ecuación de Boltzmann (expresión 15)

$$Y = Y_{\min} + (Y_{\max} - Y_{\min}) / \{1 + \exp[(X_0 - X)/dx]\}, \text{ expresión 15}$$

donde *Y* es el cociente AUC-PAP<sub>f</sub>/AUC-PAP<sub>i</sub>, *Y<sub>max</sub>* e *Y<sub>min</sub>* son respectivamente sus valores máximos y mínimos, *x* es el T<sub>VSM</sub>, *x<sub>0</sub>* es el T<sub>VSM</sub> correspondiente a *Y<sub>max</sub>*/2 y *dx* es la pendiente.

### 3.6.14 Probabilidad de alcanzar la diana terapéutica. Simulación de Monte Carlo

Mediante simulaciones Monte Carlo se estimó la probabilidad de alcanzar o superar la magnitud del cociente AUC/CMI relacionada con el efecto terapéutico ( $AUC/CMI_{80}$ ) y la supresión de resistencias (MSR) en los pacientes infectados con cepas de CMI de entre 0,015 µg/ml y 32 µg/ml tratados con dosis orales de 200 mg, 400 mg y 800 mg. En paralelo se estimó la probabilidad de éxito de la dosis de 400 mg administrada por primera vez o tras múltiples dosis (estado estacionario) o teniendo en cuenta la distribución de concentraciones en el líquido epitelial (ELF).

Las simulaciones fueron desarrolladas sobre 10.000 sujetos empleando el programa Crystal Ball (Decisioneering, Inc., Denver CO) a partir de los datos de farmacocinética poblacional de moxifloxacin (tabla 6) y la expresión farmacocinética-farmacodinámica, AUC/CMI, donde AUC es el área bajo la curva correspondiente al periodo de dosificación 0-24. Cuando el AUC no se encontró disponible fue calculado a partir de la ecuación no compartimental (expresión 16)

$$AUC = D/V_{ss} \times K_e, \text{ expresión 16}$$

donde D es la dosis,  $V_{ss}$  el volumen de distribución en el compartimento central en el estado estacionario, y  $K_e$  la constante de eliminación. El impacto de la unión a proteínas plasmáticas en la fracción de pacientes que podría alcanzar la diana farmacodinámica, se determinó en paralelo a partir de la expresión (expresión 17)

$$(1-f) \cdot AUC/CMI, \text{ expresión 17}$$

donde  $f$  es la fracción de antibacteriano unida a proteínas.

**Tabla 6:** Datos farmacocinéticos empleados en la simulación de Monte Carlo

Dosis (mg)	Vía	Compartimento	AUC (µg/ml·h) ±desviación estándar	Referencia
200	oral	plasmático	15.4±1.2	1
400 (primera)	oral	plasmático	36.1±9.1	2
400 (múltiple)	oral	plasmático	39.3±8.6	1
800	oral	plasmático	59.9±1.24	3
400	oral	LRE	189,0±56.7*	4

Unión a proteínas plasmáticas; 40% (305)

<sup>1</sup>298; <sup>2</sup>305; <sup>3</sup>304; <sup>4</sup>295.

\*desviación estándar considerando una variabilidad media del 30% (calculada a partir de la variabilidad propia de los datos concentración-tiempo)

Se asumió una distribución log-normal para los datos farmacocinéticos durante la simulación.

El punto de corte farmacodinámico para cepas sensibles fue definido como el valor de CMI más elevado que presentó una probabilidad ≥90% de alcanzar la diana farmacodinámica.

La proporción de los pacientes infectados que podría alcanzar la EC80 o la MRS con un tratamiento de moxifloxacin a dosis orales o intravenosas de 200 mg, 400 mg y 800 mg en función de la prevalencia del medio a partir del sumatorio de las proporciones de sujetos que

alcanzan la diana farmacodinámica para cada nivel de CMI multiplicado por la fracción de distribución de microorganismos encontrados en ese nivel (relación entre el número de cepas inhibidas a un valor de CMI y el número total de aislados). Asumiendo que los resultados de sensibilidad a moxifloxacino son variables dependiendo de las series revisadas, la aproximación de realizó empleando tres distribuciones diferentes:

- 1) La distribución obtenida en esta memoria, serie multicéntrica con exclusión de aislados según criterios genéticos y sensibilidad obtenida mediante el método de la dilución en agar,
- 2) Serie procedente de un único centro con exclusión de aislados según criterios genéticos y sensibilidad obtenida mediante el método de la dilución en agar (135)
- 3) Serie recopilada por el EUCAST ([http://www.eucast.org/mic\\_distributions](http://www.eucast.org/mic_distributions)), que agrupa a 695 aislados procedentes de diferentes superficies y centros en todo el mundo.

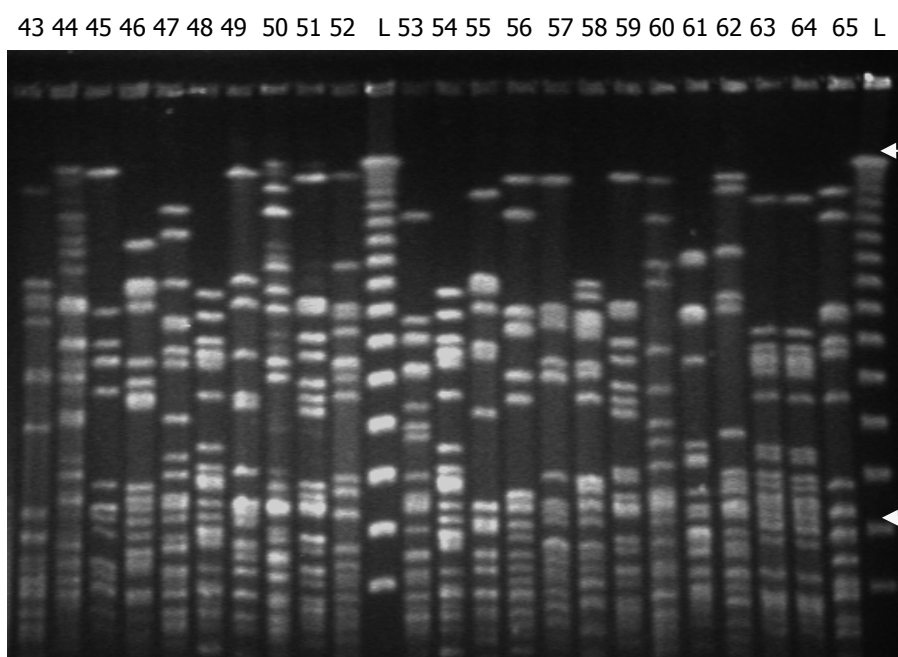
La transformación de los datos y la comparación entre las proporciones estimadas para la droga total y libre y dosis, vía y localización de los niveles dentro de cada serie o entre series, fue realizada mediante el test de la chi-cuadrado o el test exacto de Fisher si fue requerido. El valor alfa fue ajustado a 0.05

## **4. RESULTADOS**



#### 4.1 Análisis del perfil de macrorestricción de *S. maltophilia*

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) tras la digestión con XbaI resolvió fragmentos de restricción con un tamaño de  $<48\text{Kbp}$  a  $>1000\text{ Kbp}$  (figura 16). Empleando los fragmentos o bandas de un tamaño superior a los  $48\text{Kbp}$  (un total de 15 bandas) el análisis comparativo de los perfiles de macrorestricción distinguió un total de 106 perfiles de PFGE diferentes en los 124 aislados clínicos examinados (tabla 7). El dendograma generado a partir de los 106 perfiles de PFGE únicos mostró similitudes genéticas que oscilaron entre el 14% y el 84% (figura 17). Con esta elevada diversidad genética se diferenciaron numerosas agrupaciones de perfiles de PFGE o *clusters* aplicando coeficientes de similitud relativamente bajos. Con coeficientes de entre el 19 y el 25% se identificaron entre 8 y 18 clusters y aumentó sustancialmente al aplicar coeficientes de similitud superiores. Empleando un 25% de similitud genética se identificaron 18 agrupaciones formadas por entre 2 y 15 perfiles de PFGE. El cluster más numeroso, grupo XI (15 perfiles de PFGE) agrupó a los perfiles genéticos más relacionados con la cepa ATCC 13637 y más relacionados entre sí (similitudes de entre el 30 y el 84%). Para este punto de corte de similitud genética, 25%, no se encontró ninguna relación entre la pertenencia a un grupo discreto y el origen clínico o geográfico del aislado.



**Figura 16.** PFGE representativo de los aislados clínicos Sme43 a Sma65. Las flechas indican 727 Kpb (arriba) y 48 Kpb (abajo) L; marcador de peso molecular

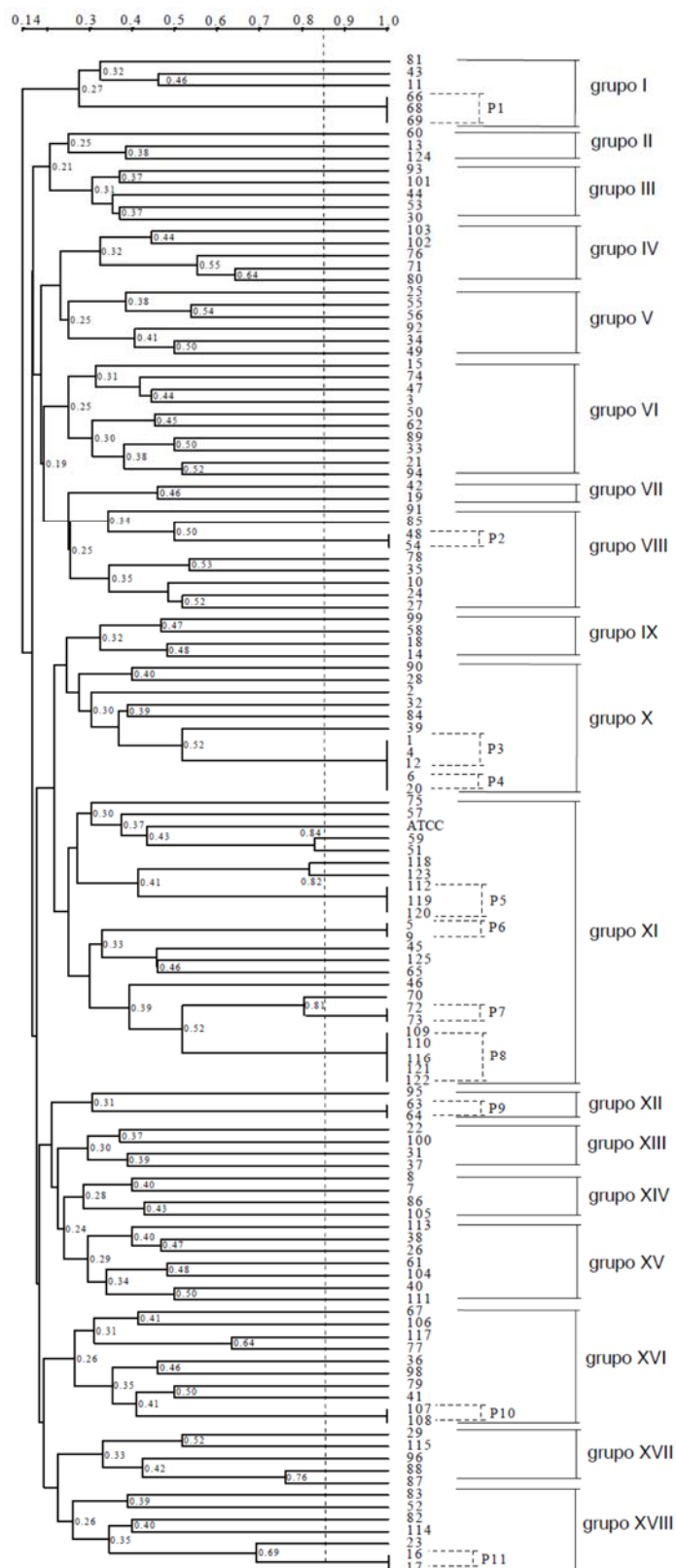
Como se refleja en la tabla 7, 28 aislados clínicos (22% del total) presentaron perfiles de macrorestricción repetidos (100% de similitud genética). Estos aislados generaron 10 perfiles de PFGE únicos (perfiles 4, 38, 54, 61, 62, 68, 69, 71, 95 y 106) y fueron obtenidos de 11 pacientes. En siete pacientes se obtuvieron 2 aislados de forma consecutiva, en 3 pacientes se obtuvieron 3 y en 1 paciente se obtuvieron 5. A excepción de dos de estos últimos 5 aislados clínicos (PFGE 69), el resto de aislamientos repetidos tuvieron el mismo origen clínico. Los

aislados del perfil de PFGE 54 se identificaron en dos pacientes diferentes ingresados en el Hospital Universitario de Salamanca constituyendo el único caso de transmisión cruzada de la serie estudiada.

**Tabla 7.** Perfiles de macrorestricción únicos identificados mediante PFGE

Aislado	PFGE	Procedencia	Aislado	PFGE	Procedencia
Sma81	1	R (Madrid-RyC)	Sma1,4,12,6,20	54	O (Salamanca)
Sma43	2	O (Ciudad Real)	Sma75	55	R (Madrid-C)
Sma11	3	O (Salamanca)	Sma57	56	O (Toledo)
Sma66,68,69	4	R (Madrid-C )	Sma59	57	O (Toledo)
Sma60	5	R (Madrid-C )	Sma51	58	R (Toledo)
Sma13	6	O (Salamanca)	Sma118	59	R (Madrid-GM)
Sma124	7	R (Madrid-GM)	Sma123	60	S (Madrid-GM)
Sma93	8	R (Toledo)	Sma112,119,120	61	S (Madrid-GM)
Sma101	9	O (Toledo)	Sma5, 9	62	O (Salamanca)
Sma44	10	R (Ciudad Real)	Sma45	63	O (Toledo)
Sma53	11	R (Toledo)	Sma125	64	R (Madrid-PH)
Sma30	12	D (Madrid)	Sma65	65	R (Madrid-C )
Sma103	13	R (Toledo)	Sma46	66	O (Toledo)
Sma102	14	R (Toledo)	Sma70	67	R (Madrid-C)
Sma76	15	R (Madrid-C)	Sma72, 73	68	R (Madrid-C)
Sma71	16	R (Madrid-C)	Sma109,116,121,110,122	69	R, H (Madrid-GM)
Sma80	17	R (Madrid-RyC)	Sma95	70	O (Toledo)
Sma25	18	O (Sevilla)	Sma63,64	71	R (Madrid-C)
Sma55	19	R (Toledo)	Sma22	72	R (Barcelona)
Sma56	20	O (Toledo)	Sma100	73	R (Toledo)
Sma92	21	S (Madrid-SO)	Sma31	74	S (Burgos)
Sma34	22	H (Zaragoza)	Sma37	75	R (Zaragoza)
Sma49	23	R (Toledo)	Sma8	76	O (Salamanca)
Sma15	24	O (Salamanca)	Sma7	77	O (Salamanca)
Sma74	25	R (Madrid-C)	Sma86	78	S (Madrid-SO)
Sma47	26	O (Toledo)	Sma105	79	O (Toledo)
Sma3	27	O (Salamanca)	Sma113	80	R (Madrid-GM)
Sma50	28	R (Toledo)	Sma38	81	R (Zaragoza)
Sma62	29	R (Madrid-C)	Sma26	82	D (Barcelona)
Sma89	30	S (Madrid-SO)	Sma61	83	R (Madrid-C)
Sma33	31	R (Zaragoza)	Sma104	84	R (Toledo)
Sma21	32	R (Murcia)	Sma40	85	H (Zaragoza)
Sma94	33	R (Toledo)	Sma111	86	S (Madrid-GM)
Sma42	34	S (Madrid-M)	Sma67	87	R (Madrid-C)
Sma19	35	O (Salamanca)	Sma106	88	R (Madrid-PH)
Sma91	36	S (Madrid-SO)	Sma117	89	R (Madrid-GM)
Sma85	37	S (Madrid-SO)	Sma77	90	R (Madrid-C)
Sma48, 54	38	R (Toledo)	Sma36	91	R (Zaragoza)
Sma78	39	R (Madrid-C)	Sma98	92	O (Toledo)
Sma35	40	R (Zaragoza)	Sma79	93	O (Madrid-PH)
Sma10	41	O (Salamanca)	Sma41	94	R (Madrid-M)
Sma24	42	R (S. Sebastián)	Sma107, 108	95	R (Madrid-PH)
Sma27	43	S (Barcelona)	Sma29	96	R (Las Palmas)
Sma99	44	O (Toledo)	Sma115	97	H (Madrid-GM)
Sma58	45	R (Toledo)	Sma96	98	R (Toledo)
Sma18	46	O (Salamanca)	Sma88	99	H (Madrid-SO)
Sma14	47	O (Salamanca)	Sma87	100	H (Madrid-SO)
Sma90	48	S (Madrid-SO)	Sma83	101	S (Madrid-SO)
Sma28	49	S (Valencia)	Sma52	102	O (Toledo)
Sma2	50	O (Salamanca)	Sma82	103	O (Madrid-SO)
Sma32	51	S (Madrid-M)	Sma114	104	H (Madrid-GM)
Sma84	52	S (Madrid-SO)	Sma23	105	H (Salamanca)
Sma39	53	H (Zaragoza)	Sma16, 17	106	O (Salamanca)

R; respiratoria, O; orina, S; sangre, H; heridas, D; otros. Hospitales; C; Clínico San Carlos, RyC; Ramón y Cajal, PH; Puerta de Hierro, GM; Gregorio Marañón, SO; Severo Ochoa, M; Moncloa



**Figura 17.** Dendrograma de similitud genética.

Las cepas con un 100% de similitud se muestran agrupadas en los pacientes de procedencia (Px). La numeración solo aplica a los pacientes con aislados repetidos y es aleatoria.

## 4.2 Sensibilidad de *S. maltophilia* a los antimicrobianos

La sensibilidad de los 106 aislados clínicos de *S. maltophilia* con un perfil de PFGE diferente, a diferentes grupos de antimicrobianos, se resume en las tablas 8-12. Los aislados clínicos repetidos de idéntico perfil de PFGE, procedentes de sucesivos aislamientos de un mismo paciente o de una transmisión cruzada entre pacientes, fueron eliminados para evitar resultados redundantes. Ante la falta de recomendaciones específicas del CLSI o del EUCAST para este microorganismo y atendiendo a las variaciones en los resultados de sensibilidad según la metodología empleada, el estudio se realizó mediante el método de dilución en agar tras una incubación de la prueba de sensibilidad de 24 o de 48 horas.

### 4.2.1 Betalactámicos

Los betalactámicos estudiados mostraron una pobre actividad frente al microorganismo (tabla 8). Ceftazidima con el 20% de cepas sensibles fue el betalactámico más activo. Más del 77% de las cepas fueron resistentes a ticarcilina, cefepima o piperacilina y más del 96% a los carbapenemas o aztreonam. Las combinaciones clásicas con inhibidores de betalactamasas, amoxicilina-ácido clavulánico o ampicilina-sulbactam no fueron activas y solo un 5% de las cepas fueron sensibles a piperacilina-tazobactam. A diferencia de estas, las combinaciones de ticarcilina, cefepima o aztreonam con ácido clavulánico (tic-clav, cef-clav o azt-clav) se mostraron altamente activas frente al microorganismo, tabla 8. La combinación con 2 µg/ml de ácido clavulánico redujo la CMI de ticarcilina, cefepima o aztreonam en al menos dos diluciones en aproximadamente el 70% de los aislados y en el 96% cuando se combinó en proporción 2:1 con aztreonam. Esta última combinación (azt-clav 2:1) redujo la CMI a aztreonam en al menos cuatro diluciones en más del 75% de los aislados. La presencia del inhibidor de betalactamasas disminuyó significativamente el porcentaje de cepas resistentes ( $p < 0,001$ , test  $\chi^2$ ), hasta el 25% con tic-clav, 12% con cef-clav, 40% con azt-clav y 9% con azt-clav 2:1, después de una incubación de la prueba de sensibilidad de 24 horas. La prolongación del periodo de incubación hasta las 48 horas afectó significativamente a la actividad de las cuatro combinaciones, aumentando entre un 8-9% la resistencia a tic-clav y cef-clav y en un 11 y 12% el número de aislados con resistencia intermedia a azt-clav y azt-clav 2:1. Independientemente del periodo de incubación, cef-clav y azt-clav 2:1 fueron significativamente más activas que tic-clav ( $p < 0,05$ ).

### 4.2.2 Quinolonas

Como se muestra en la tabla 9 moxifloxacino y clinafloxacino fueron las quinolonas más activas con una CMI para el 90% de las cepas de 1 y 2 µg/ml respectivamente. Ambos compuestos fueron del orden de 2 a 4 veces más potentes que levofloxacino, trovafloxacino y gemifloxacino, de 4 a 8 veces más potentes que gatifloxacino y de 8 a 16 veces más potentes que ciprofloxacino u ofloxacino. Adoptando el punto de corte recomendado por el CLSI para ciprofloxacino en especies relacionadas ( $\geq 4$  µg/ml), el 43% de las cepas (55% tras 48 horas de incubación de la prueba de sensibilidad) sería resistente a ciprofloxacino.

**Tabla 8.** Perfil de sensibilidad de *S. maltophilia* a diferentes betalactámicos y sus combinaciones con ácido clavulánico

Antimicrobianos <sup>a</sup>	Incubación 24 h						Incubación 48 h					
	Rango (µg/ml)	CMI (µg/ml)		Categoría de sensibilidad (% cepas)			Rango (µg/ml)	CMI (µg/ml)		Categoría de sensibilidad (% cepas)		
		CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	%S	%I	%R		CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	%S	%I	%R
Amox/clav	256->512	>512	>512	-	-	-	256->512	>512	>512	-	-	-
Amp/sulb	256->512	>512	>512	-	-	-	256->512	>512	>512	-	-	-
Cefepima <sup>a,c</sup>	1->256	32	128	7,5	15,1	77,4	2->256	64	128	6,6	9,4	84,0
Cef/clav (2) <sup>b</sup>	1->256	8	32	63,2	24,5	12,3*	1->256	8	32	52,8	26,4	20,8*
Piperacilina	4->256	>256	>256	1,9	7,5	90,6	16->256	>256	>256	1,9	2,8	95,3
Piper/taz (4)	4->256	256	>256	4,7	8,5	86,8	4->256	>256	>256	0,9	7,5	91,5
Ticarcilina <sup>a,c</sup>	4->256	256	>256	5,7	8,5	85,8	4->256	256	>256	5,7	2,8	91,5
Ticar/clav(2) <sup>b</sup>	4->256	32	128	42,5	32,1	25,5*	4->256	32	256	33,0	33,0	34,0*
Aztreonam	4->256	>256	>256	3,8	0,0	96,2	4->256	>256	>256	1,9	1,9	96,2
Azt/clav (2) <sup>d</sup>	1->256	8	>256	52,8	6,6	40,6*	2->256	16	>256	36,8	17,9	45,3*
Azt/clav(2:1) <sup>d</sup>	2-32	8	16	64,2	26,4	9,4*	4-64	8	16	51,9	38,7	9,4*
Ceftazidima	2->256	64	256	22,6	5,7	71,7	2->256	64	>256	19,8	5,7	74,5
Sulbactam	64->256	>256	>256	-	-	-	128->256	>256	>256	-	-	-
Tazobactam	128->256	>256	>256	-	-	-	128->256	>256	>256	-	-	-
Ác. clavulánico	32->256	64	128	-	-	-	32->256	128	256	-	-	-
Imipenem	64->256	>256	>256	0,0	0,0	100,0	64->256	>256	>256	0,0	0,0	100,0
Meropenem	2->256	128	>256	3,8	2,8	93,4	2->256	128	>256	2,8	0,9	96,2

<sup>a</sup> $p < 0,05$ , <sup>b</sup>  $p = 0,0077$ , aumento del número de cepas resistentes con la prolongación del periodo de incubación, <sup>c</sup> $p < 0,05$ , <sup>d</sup>  $p \leq 0,0015$ , aumento del número de cepas con resistencia intermedia con la prolongación del periodo de incubación (test McNemar's), \* $p < 0,0001$  en la actividad de las combinaciones con ácido-clavulánico vs, betalactámico ensayado individualmente

**Tabla 9.** Perfil de sensibilidad de *S. maltophilia* a quinolonas

Antimicrobianos	Incubación 24 h						Incubación 48 h					
	Rango (µg/ml)	CMI (µg/ml)		Categoría de sensibilidad (% cepas)			Rango (µg/ml)	CMI (µg/ml)		Categoría de sensibilidad (% cepas)		
		CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	%S	%I	%R		CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	%S	%I	%R
Ácido nalidíxico <sup>a</sup>	2-512	16	64	68,9	-	31,1	2-512	16	128	51,9	-	48,1
Norfloxacino	1-512	16	64	2,8	17,9	79,2	1->512	16	64	2,8	13,2	84,0
Ciprofloxacino <sup>a</sup>	0,25-128	4	16	20,8	35,8	43,4	0,25-128	4	16	13,2	31,1	55,7
Ofloxacino <sup>b</sup>	0,25-128	2	16	53,8	19,8	26,4	0,25-128	4	16	40,6	30,2	29,2
Levofloxacino	0,125-64	1	4	76,4	14,2	9,4*	0,125-64	2	8	72,6	17,0	10,4*
Moxifloxacino	0,03-32	0,5	2	90,6	0,0	9,4*	0,03-32	1	4	87,7	0,0	12,3*
Gatifloxacino	0,06-64	1	8	81,1	7,5	11,3*	0,06-64	2	8	78,3	10,4	11,3*
Trovafloxacino <sup>a</sup>	0,03-64	1	4	84,9	0,0	15,1*	0,03-64	2	4	71,7	0,0	28,3
Clinafloxacino	0,015-4	0,25	1	94,3	4,7	0,9*	0,03-4	0,25	1	93,4	3,8	2,8*
Gemifloxacino <sup>a,b</sup>	0,125-256	1	4	67,0	18,9	14,2*	0,125-256	2	8	44,3	28,3	27,3

<sup>a</sup> $p < 0,001$ , aumento del número de cepas resistentes con la prolongación del periodo de incubación, <sup>b</sup> $p < 0,05$ , aumento del número de cepas con resistencia intermedia con la prolongación del periodo de incubación (test McNemar's), \* $p < 0,0001$ , porcentaje de cepas resistentes vs ciprofloxacino según tiempo de lectura (test  $\chi^2$ )

Clinafloxacin (<1-2,8%) o moxifloxacin (9,4-12,3%) empleando un punto de corte de  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$  y levofloxacin (9,4-10,4%) o gatifloxacin (11,3%) empleando un punto de corte de  $\geq 8$   $\mu\text{g/ml}$  exhibieron un porcentaje de cepas resistencias significativamente más bajo ( $p < 0,001$ ) independientemente del tiempo de incubación de la prueba de sensibilidad. El número de cepas resistentes fue también inferior con trovafloxacin y gemifloxacin. El ácido nalidíxico exhibió tres veces más cepas sensibles que ciprofloxacino adoptando los puntos de corte disponibles en especies gramnegativas.

Como se detalla en la tabla 9, la prolongación del tiempo de lectura hasta las 48 horas no modificó significativamente los resultados para algunas quinolonas como levofloxacin, moxifloxacin, gatifloxacin o clinafloxacin pero si para otras como trovafloxacin o gemifloxacin que duplicaron el porcentaje de cepas resistentes.

Después de 48 horas de incubación más del 87% de los aislados fueron sensibles a moxifloxacin o clinafloxacin, muy por encima del porcentaje de cepas sensibles detectado con gemifloxacin (44%), levofloxacin o trovafloxacin (72%) y gatifloxacin (78%).

Como se muestra en la tabla 10, estos cálculos variarían sustancialmente para algunas quinolonas, especialmente las nuevas fluorquinolonas, si tenemos en cuenta las concentraciones potenciales en tejidos. Moxifloxacin o gatifloxacin inhibirían prácticamente al 100% de las cepas a las concentraciones alcanzadas en diferentes compartimentos del tejido pulmonar. En cambio con levofloxacin, a pesar de la buena penetración en tejido pulmonar o ciprofloxacino, de pobre penetración en tejidos pulmonares con un perfil en tejidos muy parecido al del suero, no reducirían su resistencia.

**Tabla 10.** Concentraciones en tejido respiratorio y porcentaje de cepas resistentes de varias quinolonas

Antimicrobiano	Dosis/ $C_{\text{max}}$ suero	LRE			Macrófagos alveolares		
		$C_{\text{max}}^a$	% cepas resistentes		$C_{\text{max}}^a$	% cepas resistentes	
			24h	48h		24h	48h
Ciprofloxacino	500 mg p.o./2,9	2,1	43,4	55,6	7,6	43,4	55,6
Levofloxacin	500 mg p.o./5,9	15,2	9,4	10,4	28,5	9,4	10,4
Moxifloxacin	400 mg p.o./3,3	20,7	0,9	1,9	56,7	0	0
Gatifloxacin	400 mg p.o./3,4	6,16	11,3	11,3	77,3	0	0
Trovafloxacin	200 mg p.o./2,1	4,9	8,4	9,4	-	-	-

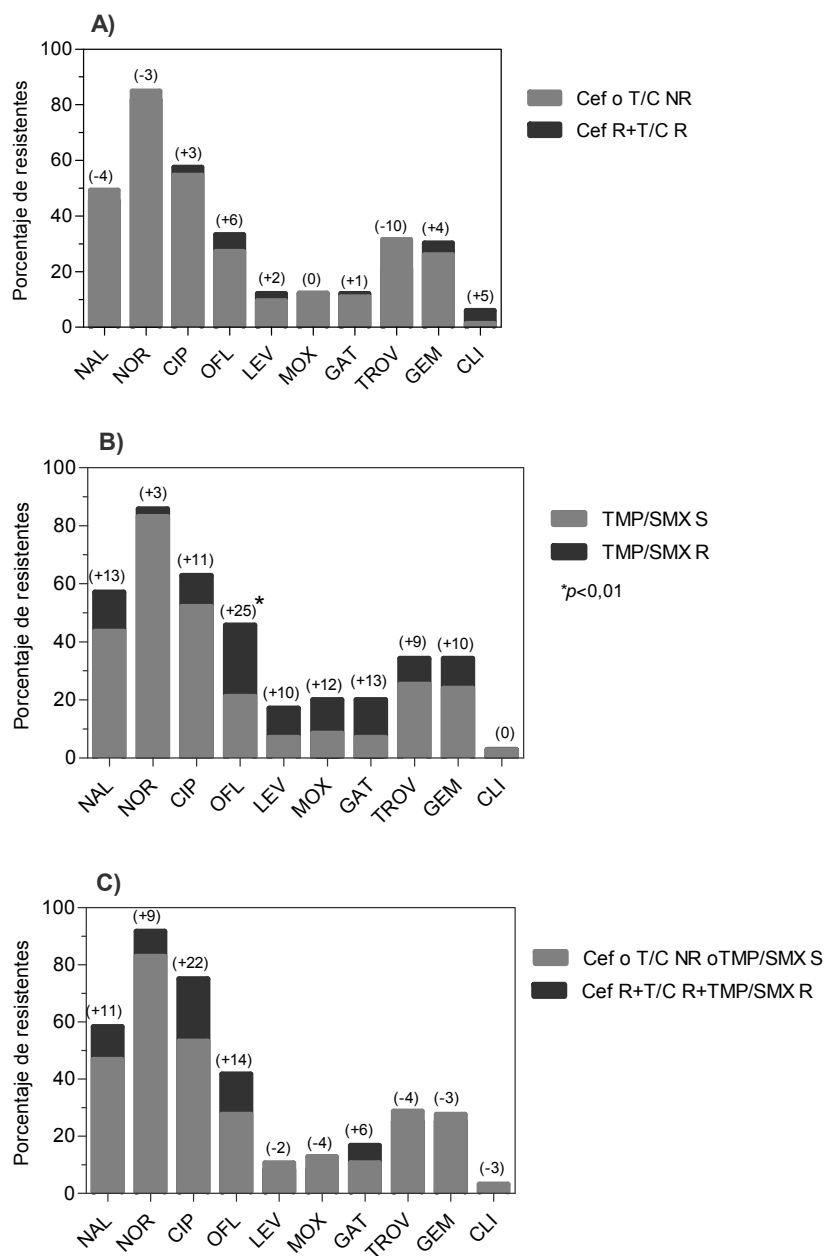
<sup>a</sup> 304,337,338,339

#### 4.2.3 Actividad de las quinolonas en cepas resistentes a ticarcilina-ácido clavulánico y/o cotrimoxazol

La actividad de las quinolonas frente a cepas resistentes a ceftazidima y ticarcilina-ácido clavulánico ( $n=33$ ), resistentes a cotrimoxazol ( $n=35$ ) o resistentes a ceftazidima, ticarcilina-ácido clavulánico y cotrimoxazol ( $n=12$ ), se representa en la figura 18.

Como se muestra en la figura 18A después de 48 de incubación de la prueba de sensibilidad, no existieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ , test  $\chi^2$ ) en la actividad de las quinolonas entre el grupo de cepas con resistencia simultánea a ceftazidima y ticarcilina-ácido clavulánico y el

grupo de cepas no resistente a uno o ambos antimicrobianos. A excepción de ofloxacino la actividad tampoco fue significativamente diferente entre cepas sensibles y resistentes a cotrimoxazol (figura 18B) aunque en general la frecuencia de aparición de cepas resistentes a quinolonas fue sensiblemente superior en el grupo de cepas resistentes a cotrimoxazol (entre el 0-13%).



**Figura 18.** Distribución de la resistencia a quinolonas entre cepas no resistentes y resistentes a ceftazidima (Cef) y ticarcilina-ácido clavulánico (T/C), A, entre cepas sensibles y resistentes a cotrimoxazol (TMP/SMX), B, y entre cepas no resistentes a Cef y T/C, sensibles a cotrimoxazol y resistentes a Cef, T/C y cotrimoxazol, C. La variación en el porcentaje de resistentes entre ambos grupos se expresa numéricamente.



En este grupo de cepas resistentes a cotrimoxazol el 100% fue sensible a clinafloxacino, el 80% a moxifloxacino, el 74% a gatifloxacino, por tan solo un 14% de cepas sensibles a ciprofloxacino. Como se comentó más arriba el número de cepas resistentes sería todavía inferior para algunas quinolonas de acuerdo a la disposición de concentraciones en tejidos. Solo 1 de las 7 cepas resistentes a cotrimoxazol y moxifloxacino presentó una CMI superior a la  $C_{max}$  alcanzada en el LRE por 7 de 7 cepas resistentes a cotrimoxazol y gatifloxacino. Ninguna de estas cepas resistentes exhibió una  $C_{max}$  superior a la alcanzada en macrófagos alveolares. Como se aprecia en la figura 18C, la acumulación de resistencias en *S. maltophilia* afectó principalmente a la actividad de las quinolonas clásicas (ácido nalidíxico, norfloxacino, ofloxacino o ciprofloxacino). No existieron diferencias importantes en la actividad de las nuevas quinolonas (levofloxacino, moxifloxacino, gatifloxacino, trovafloxacino, gemifloxacino o clinafloxacino) entre las cepas resistentes a ceftazidima, ticarcilina ácido clavulánico y cotrimoxazol y las cepas no resistentes a uno o varios de estos antimicrobianos.

#### 4.2.4 Aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas, cotrimoxazol y otros

La actividad de aminoglucósidos, macrólidos, polimixinas, fosfomicina y rifampicina, como se muestra en la tabla 11 fue muy reducida en esta especie. Más del 79% de las cepas fueron resistentes de acuerdo a los puntos de corte empleados.

Cotrimoxazol, considerado terapia de choque exhibió un 72% de cepas sensibles después de 24 horas de incubación de la prueba de sensibilidad: la extensión del tiempo de incubación de la prueba de sensibilidad no afectó a los resultados obtenidos. Hay que destacar que el 28% de los aislados (CMI a las 48h) mostró resistencia de alto nivel a cotrimoxazol ( $CMI \geq 8 \mu g/ml$ ).

El porcentaje de cepas resistentes a cloranfenicol fue muy similar a cotrimoxazol aunque tan solo un 18% de las cepas se situaron en la categoría de cepas sensibles. La extensión de la incubación de la prueba de sensibilidad afectó significativamente ( $p \leq 0,0001$ ) a los resultados desplazando más del 30% de los aislados a la categoría de cepas resistentes.

En el grupo de tetraciclinas, doxiciclina, minociclina y su derivado semisintético, tigeciclina (minociclina 9-t-butilglicilamida) mostraron una potencia antimicrobiana de 3-4 veces superior a tetraciclina. Aplicando un punto de corte de sensibilidad microbiológica de  $\leq 4 \mu g/ml$  (CLSI) para tetraciclina, minociclina o doxiciclina o de  $\leq 2 \mu g/ml$  para tigeciclina (FDA) más del 90% de los aislados serían sensibles a doxiciclina, minociclina o tigeciclina, un porcentaje significativamente ( $p < 0,0001$ ) más elevado que el cepas sensibles a tetraciclina. La extensión del tiempo de incubación hasta las 48 horas, tabla 11, incremento significativamente el porcentaje de cepas con resistencia intermedia a minociclina 20,8%,  $p=0,0002$  y doxiciclina, 12,3%  $p=0,0138$  pero no a tigeciclina, muy estable ante esta variación.

El comportamiento de tigeciclina frente a los aislados no sensibles a doxiciclina o minociclina se resume en la tabla 12. Tigeciclina fue sensible en el 60% de los aislados no sensibles de forma simultánea a doxiciclina y minociclina. Esta actividad fue independiente del fenotipo de resistencia a cotrimoxazol.

**Tabla 11.** Perfil de sensibilidad de *S. maltophilia* a tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos, polipéptidos y otros

Antimicrobianos	Incubación 24 h						Incubación 48 h					
	Rango (µg/ml)	CMI (µg/ml)		Categoría de sensibilidad (% cepas)			Rango (µg/ml)	CMI (µg/ml)		Categoría de sensibilidad (% cepas)		
		CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	%S	%I	%R		CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	%S	%I	%R
Tetraciclina <sup>a,c</sup>	2-64	16	32	2,8	14,2	83,0	4-64	32	32	0,9	1,9	97,2
Doxicilina <sup>d</sup>	0,125-8	2	4	90,6	9,4	0,0	0,25-8	4	8	78,3	21,7	0,0
Minociclina <sup>d</sup>	0,25-8	4	4	93,4	6,6	0,0	0,5-16	4	8	71,7	27,4	0,9
Tigeciclina	<0,25-4	0,5	2	91,5	8,5	0,0	<0,25-4	1	2	91,5	8,5	0,0
Eritromicina	16-512	128	256	-	-	-	16-1024	256	512	-	-	-
Claritromicina	16-512	128	256	-	-	-	16-512	128	256	-	-	-
Azitromicina	8-256	64	128	-	-	-	8-256	64	128	-	-	-
Gentamicina	2-256	128	>256	7,5	6,6	85,8	2-256	128	>256	6,6	3,8	89,6
Amikacina	1-256	256	>256	4,7	3,8	91,5	1-256	256	>256	4,7	3,8	91,5
Tobramicina	1->512	32	>512	6,6	8,5	84,9	1->512	32	>512	6,6	8,5	84,9
Cloranfenicol <sup>b,d</sup>	8-128	16	32	18,9	53,8	27,4	8-128	32	64	7,5	37,7	54,7
Rifampicina <sup>a,c</sup>	0,5-64	8	16	2,8	14,2	83,0	1-128	8	32	0,9	5,7	93,4
Fosfomicina <sup>b,d</sup>	64-256	128	256	0,0	20,8	79,2	64-512	128	256	0,0	2,8	97,2
Colistina	0,25-256	32	128	9,4	0,0	90,6	0,25-256	32	128	9,4	0,0	90,6
Polimixina B	0,5-128	32	128	7,5	0,0	92,5	0,5-256	32	128	7,5	0,0	92,5
Cotrimoxazol	0,25-128	2	64	71,7	0,0	28,3	0,25-256	2	128	67,0	0,0	33,0

<sup>a</sup> $p \leq 0,01$ , <sup>b</sup> $p < 0,0001$  aumento del número de cepas resistentes con la prolongación del periodo de incubación, <sup>c</sup> $p < 0,0077$ , <sup>d</sup> $p \leq 0,0001$  aumento del número de cepas con resistencia intermedia con la prolongación del periodo de incubación (test McNemar's)

**Tabla 12.** Distribución de los aislados en categorías de sensibilidad a tigeciclina (48 horas)

Todos los aislados ( <i>n</i> =106)	S ≤ 2 µg/ml	I =4µg/ml	R ≥ 8 µg/ml
DOX I ( <i>n</i> =23)	91,5	8,5	0,0
MIN I ( <i>n</i> =28)	75,0	25,0	0,0
DOX, I; MIN I ( <i>n</i> =17)	58,8	41,2	0,0
DOX, I; MIN I; cotrimoxazol R ( <i>n</i> =8)	50,0	50,0	0,0
Cotrimoxazol ( <i>n</i> =35)	85,7	14,3	0,0

#### 4.2.5 Variación de la sensibilidad en función del criterio de selección de los aislados clínicos

La aplicación de criterios demográficos en la serie completa de aislados, *n*=124 aislados, dejó disponibles para el análisis a un total de 108 cepas procedentes de 107 pacientes diferentes. Según este criterio demográfico se descartaron para el análisis los aislados clínicos obtenidos de forma consecutiva en un mismo paciente si el origen clínico de la muestra fue el mismo. Al aplicar el criterio de exclusión genotípico (ver resultados de sensibilidad arriba) se incluyeron en análisis 106 cepas. Los aislados clínicos responsables de transmisiones cruzadas o cepas repetidas procedentes del mismo paciente, aisladas de muestras clínicas con un origen diferente quedaron excluidos.

La variación en el porcentaje de cepas resistentes a diferentes antimicrobianos después de una incubación de 24 horas y la aplicación de los distintos criterios de exclusión referidos se muestran en la tabla 13. Con la aplicación del criterio demográfico se observaron ligeros descensos en el porcentaje de cepas resistentes, 0,1-2,6%, en diversos antibacterianos como quinolonas, aminoglucósidos, rifampicina y cotrimoxazol, y aumentos de entre el 0,4-5,1%, sobre la mayoría de betalactámicos y combinaciones con inhibidores de betalactamasas analizadas. La aplicación del criterio genotípico pronunció aún más las diferencias en el porcentaje de cepas resistentes con reducciones de hasta el 4% en quinolonas, aminoglucósidos, rifampicina y cotrimoxazol y aumentos de hasta el 6% en el grupo de los betalactámicos y combinaciones con inhibidores de betalactamasas respectivamente. Como se muestra en la tabla 14, estas variaciones respondieron a una acumulación de aislamientos resistentes a quinolonas, aminoglucósidos, rifampicina y cotrimoxazol y a una acumulación de aislamientos sensibles en general a todos los betalactámicos, excepto ceftazidima o meropenem e imipenem. La incubación prolongada a 48 horas redujo las diferencias en el porcentaje de cepas resistentes existentes entre los grupos de cepas con patrón genético único y repetido. La sensibilidad de las cepas pertenecientes a un mismo clon fue prácticamente idéntica (+/- 1 dilución log<sub>2</sub>).

**Tabla 13.** Porcentaje de cepas resistentes considerando la aplicación de los siguientes criterios de exclusión de aislados del análisis de sensibilidad.

Antimicrobianos	Resistentes (%) tras incubación de 24 h		
	Aislados totales, sin exclusión <i>n</i> =124	Aislados tras exclusión demográfica <i>n</i> =108	Aislados tras exclusión genotípica (PFGE único) <i>n</i> =106
Ácido nalidíxico	31,4	30,6	31,1
Norfloxacino	81,4	79,6	79,2
Ciprofloxacino	42,7	42,6	43,4
Ofloxacino	28,2	26,8	26,4
Levofloxacino	12,1	9,3	9,4
Moxifloxacino	11,3	9,3	9,4
Gatifloxacino	12,9	11,1	11,3
Trovafloracino	16,9	14,8	15,1
Clinafloxacino	0,8	0,9	0,9
Gemifloxacino	16,1	13,9	14,2
Tetraciclina	83,1	83,3	83,0
Doxicilina	0,0	0,0	0,0
Minociclina	0,0	0,0	0,0
Tigeciclina	0,0	0,0	0,0
Gentamicina	87,9	86,1	85,8
Amikacina	91,9	91,7	91,5
Tobramicina	87,1	85,2	84,9
Cloranfenicol	26,6	26,8	27,4
Rifampicina	85,5	83,3	83,0
Fosfomicina	78,2	79,63	79,2
Cotrimoxazol	32,3	29,6	28,3
Cefepima	77,4	77,8	77,4
Cefepima-clav (2)	10,5	12,0	12,3
Piperacilina	91,1	90,7	90,6
Piperacilina-Taz (4)	83,9	87,0	86,8
Ticarcilina	83,1	86,1	85,8
Ticarc/clav(2)	22,6	19,4	25,5
Aztreonam	96,0	96,3	96,2
Aztr/clav (2)	34,7	39,8	40,6
Aztr/clav(2:1)	8,1	9,3	9,4
Ceftazidima	72,6	72,2	71,7
Imipenem	99,2	100,0	100,0
Meropenem	92,7	93,5	93,4

$p > 0,05$  en el % de cepas resistentes vs, criterio de selección. Clav.; ácido clavulánico. Taz; tazobactam.

Ticar; ticarcilina. Aztr; aztreonam. (2); 2 µg/ml. (4); 4 µg/ml. (2:1); proporción 2:1.

**Tabla 14.** Porcentaje de cepas resistentes considerando la aplicación de los siguientes criterios de exclusión de aislados del análisis de sensibilidad

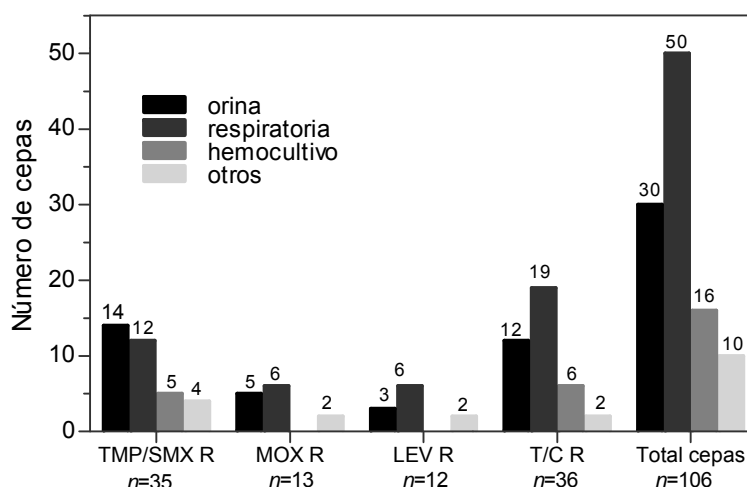
Antimicrobianos	Resistentes (%) tras 24h/48 h		% resistencia acumulada en aislamientos con PFGE repetido (24h/48h)
	Aislados con PFGE no repetido <i>n</i> =96	Aislados con PFGE repetido <i>n</i> =28	
Ácido nalidíxico	30,2/47,9	35,7/42,9	+ 5,5/- 5,1
Norfloxacino	77,1/82,3	96,4/96,4	+ 19,3 ( <i>p</i> =0,025)/+ 14,1
Ciprofloxacino	41,7/55,2	46,4/57,1	+ 4,8/ + 1,9
Ofloxacino	24,0/26,0	42,9/50,0	+ 18,9/ + 24,0 ( <i>p</i> =0,021)
Levofloxacino	8,3/9,4	25,0/25,0	+ 16,7 ( <i>p</i> =0,042)/+ 15,6
Moxifloxacino	8,3/11,5	21,4/21,4	+ 13,1/+ 10,0
Gatifloxacino	9,4/9,4	25,0/25,0	+ 15,6 ( <i>p</i> =0,05)/+ 15,6 ( <i>p</i> =0,05)
Trovafloracino	14,6/27,1	25,0/35,7	+ 10,4/+ 8,6
Clinafloxacino	1,0/3,1	0,0/0,0	-1,0/- 3,1
Gemifloxacino	12,5/26,0	28,6/35,7	+ 16,1/+ 9,7
Tetraciclina	82,3/96,9	85,7/92,9	+ 3,4/- 4,0
Doxicilina	0,0/0,0	0,0/0,0	0,0/0,0
Minociclina	0,0/1,0	0,0/3,6	0,0/+ 2,5
Tigeciclina	0,0/0,0	0,0/0,0	0,0/0,0
Gentamicina	84,4/88,5	100,0/100,0	+ 15,6 ( <i>p</i> =0,022)/+ 11,5
Amikacina	90,6/90,6	96,4/96,4	+ 5,8/ + 5,8
Tobramicina	84,4/84,4	96,4/96,4	+ 12,1/+ 12,1
Cloranfenicol	26,0/53,1	28,6/64,3	+ 2,5/+ 11,2
Rifampicina	81,3/92,7	100,0/100,0	+ 18,8 ( <i>p</i> =0,012)/+ 7,3
Fosfomicina	78,1/96,9	78,6/92,9	+ 0,4/- 4
Cotrimoxazol	26,0/31,3	53,6/53,6	+ 27,5 ( <i>p</i> =0,011)/+ 22,3 ( <i>p</i> =0,044)
Cefepima	76,0/83,3	82,1/89,3	+ 6,1/+ 6,0
Cefepima-clav (2)	13,5/21,8	0,0/10,7	- 13,5 ( <i>p</i> =0,039)/- 10,1
Piperacilina	89,6/94,8	96,4/100,0	+ 6,8/+ 5,2
Piperacilina-Taz (4)	86,5/90,6	75,0/96,4	- 11,5/+ 5,8
Ticarcilina	85,4/91,7	75,0/89,7	-10,4/- 6
Ticarc/clav(2)	26,0/35,4	7,1/7,1	-18,9 ( <i>p</i> =0,038)/- 28,3 ( <i>p</i> =0,004)
Aztreonam	96,9/96,9	92,9/92,9	-4,0/- 4,0
Aztr/clav (2)	42,7/46,9	7,1/21,4	-35,6 ( <i>p</i> <0,001)/-25,4 ( <i>p</i> =0,017)
Aztr/clav(2:1)	10,4/10,4	0,0/0,0	-10,4/- 10,4
Ceftazidima	68,8/71,9	85,7/85,7	+ 17,0/+ 13,8
Imipenem	100,0/100	96,4/100,0	-3,6/0,0
Meropenem	93,8/96,8	89,3/92,9	-4,5/- 3,0

Clav.; ácido clavulánico. Taz; tazobactam. Ticar; ticarcilina. Aztr; aztreonam. (2); 2 µg/ml. (4); 4 µg/ml. (2:1); proporción 2:1.

#### 4.2.6 Diferencias en la sensibilidad de acuerdo a la fuente de aislamiento

El origen de las cepas con un patrón de restricción mediante PFGE único procedió mayoritariamente de muestras respiratorias, 47,2%, urinarias, 28,3% y de hemocultivos, 15,1%. Un 9,4% fue obtenido de otras localizaciones menores. Entre un 75-85% de los aislados resistentes a moxifloxacino (*n*=13), levofloxacino (*n*=12), ticarcilina-ácido clavulánico (*n*=36) y cotrimoxazol (*n*=35), fueron obtenidos de muestras respiratorias y urinarias (figura 19). De acuerdo al total de cepas obtenidas de acuerdo a origen, las cepas resistentes a quinolonas o ticarcilina clavulánico prevalecieron por igual en muestras respiratorias y urinarias.

En cambio el número de aislados resistentes a cotrimoxazol que procedió de las muestras urinarias, 14 de 30 (47%) fue significativamente superior (test  $\chi^2$ ,  $p=0,036$ ) al número de aislados resistentes procedentes de muestras respiratorias, 12 de 50 (24%).



**Figura 19.** Origen clínico de los aislados resistentes a cotrimoxazol, ticarcilina-ácido clavulánico y fluorquinolonas

#### 4.2.7 Variaciones en los resultados de sensibilidad de las quinolonas dependientes del método y de las condiciones de incubación de las pruebas

Como se resume en las tablas 15 y 16 los resultados de sensibilidad de las quinolonas seleccionadas fueron sustancialmente diferentes dependiendo del método de sensibilidad empleado, microdilución en caldo o dilución en agar, y de la extensión de la incubación de la prueba. Bajo las condiciones de incubación estándar recomendadas por el CLSI, temperatura de 35°C, atmósfera de O<sub>2</sub> y un periodo de incubación de 20h, clinafloxacino (1,5-4,5%), moxifloxacino (4,5-9%) y levofloxacino (6-9%) presentaron el menor porcentaje de cepas resistentes con escasa variación en los resultados según el método utilizado. Gatifloxacino, ácido nalidíxico y ciprofloxacino presentaron un porcentaje de resistencia superior, más acusado con la dilución en agar (14,5, 22 y 50% respectivamente) que con la microdilución en caldo (10,4, 9 y 31,3% respectivamente). La extensión del periodo de incubación hasta las 24 o 48 horas, redujo el porcentaje de cepas dispuestas dentro del intervalo de CMI de  $\pm 1 \log_2$  con respecto a la lectura de 20 horas, aumentó los porcentajes de cepas resistentes y el número de errores mayores (atribuido al aumento del número de cepas resistentes con el método propuesto frente al obtenido con el de referencia).

**Tabla 15.** Resultados de sensibilidad mediante la dilución en agar al aplicar las condiciones de incubación propuestas (resistencia en %, R) y variación ( $\log_2$  y número de errores) con respecto a las condiciones estándar del CLSI

Quinolona	Inc.	nº de cepas con diferencias en $\log_2$ (respecto método de referencia):							% $\pm$ 1 $\log_2$	% R	nº de errores	
		$\leq -3$	-2	-1	0	1	2	$\geq 3$			mayores	graves
ácido nalidíxico	20	0	0	0	67	0	0	0	100.0	22.4	0	0
	24	0	0	0	38	26	2	1	95.5	32.8*	7	0
	48	0	0	0	18	38	9	2	83.6	46.3	16	0
ciprofloxacino	20	0	0	0	67	0	0	0	100.0	50.7	0	0
	24	0	0	0	62	5	0	0	100.0	53.7	0	0
	48	0	0	0	43	22	2	0	97.0	65.7	0	0
levofloxacino	20	0	0	0	67	0	0	0	100.0	9.0	0	0
	24	0	0	0	42	24	1	0	98.5	10.4	0	0
	48	0	0	0	25	39	3	0	95.5	10.4*	0	0
moxifloxacino	20	0	0	0	67	0	0	0	100.0	9.0	0	0
	24	0	0	0	46	21	0	0	100.0	13.4	0	0
	48	0	0	0	22	37	8	0	88.1	16.4	1	0
gatifloxacino	20	0	0	0	67	0	0	0	100.0	14.9	0	0
	24	0	0	0	44	22	1	0	98.5	17.9	0	0
	48	0	0	0	33	33	1	0	98.5	19.4	0	0
clinafloxacino	20	0	0	0	67	0	0	0	100.0	1.5	0	0
	24	0	0	0	46	20	1	0	98.5	1.5	0	0
	48	0	0	0	28	34	5	0	92.5	4.5	2	0

Distribución en las categorías de sensibilidad, S, I, R con respecto al estándar del CLSI, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ,  $\chi^2$ . Inc. Periodo de incubación.

**Tabla 16.** Resultados de sensibilidad mediante la microdilución en caldo al aplicar las condiciones de incubación propuestas (resistencia en %, R) y variación (en  $\log_2$  y número de errores) con respecto a las condiciones estándar del CLSI

Quinolona	Inc.	nº de cepas con diferencias en $\log_2$ (respecto método de referencia):							% $\pm$ 1 $\log_2$	% R	nº de errores	
		$\leq -3$	-2	-1	0	1	2	$\geq 3$			mayores	graves
ácido nalidíxico	20	0	0	0	67	0	0	0	100.0	9.0	0	0
	24	0	0	0	26	30	9	2	83.6	32.8**	16	0
	48	0	0	0	1	17	25	24	26.9	74.6**	44	0
ciprofloxacino	20	0	0	0	67	0	0	0	100.0	31.3	0	0
	24	0	0	0	47	15	4	1	92.5	47.8	3	0
	48	0	0	0	13	23	15	16	53.7	80.6**	17	0
levofloxacino	20	0	0	0	67	0	0	0	100.0	6.0	0	0
	24	0	0	0	37	21	7	2	86.6	9.0*	1	0
	48	0	0	0	4	24	26	13	41.8	20.9**	9	0
moxifloxacino	20	0	0	0	67	0	0	0	100.0	4.5	0	0
	24	0	0	0	41	18	6	2	88.1	11.9	2	0
	48	0	0	0	5	25	23	14	44.8	19.4**	6	0
gatifloxacino	20	0	0	0	67	0	0	0	100.0	10.4	0	0
	24	0	0	0	36	24	7	0	89.6	16.4	2	0
	48	0	0	0	9	32	16	10	61.2	31.3**	10	0
clinafloxacino	20	0	0	0	67	0	0	0	100.0	3.0	0	0
	24	0	0	1	26	29	7	4	83.6	4.5	0	0
	48	0	0	0	9	24	23	11	49.3	11.9**	4	0

Distribución en las categorías de sensibilidad, S, I, R con respecto al estándar del CLSI, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ,  $\chi^2$ . Inc. Periodo de incubación.

Las variaciones fueron prácticamente inapreciables con la dilución en agar, pero muy significativas con la microdilución en caldo, especialmente al comparar los resultados obtenidos tras 20 horas y 48 horas de incubación (tabla 17).

Los resultados de sensibilidad obtenidos con la dilución en agar tras 18 horas de incubación no fueron significativamente diferentes a los obtenidos con la microdilución en caldo para las nuevas fluorquinolonas, pero si para ácido nalidíxico y ciprofloxacino (tabla 18). Después de 24 horas de incubación la distribución en categorías de sensibilidad con ambos métodos fue similar. En cambio con la máxima extensión de la incubación el porcentaje de cepas resistentes detectado con la microdilución se incrementó sustancialmente en todas las quinolonas y significativamente para ácido nalidíxico, ciprofloxacino, levofloxacino y clinafloxacino (tabla 18) Como se muestra en la tabla 19, la correlación de los resultados de sensibilidad entre las diferentes variantes propuestas para la dilución en agar osciló entre 0,81 y 0,97 (media, 0,92) mientras que con la microdilución en caldo la correlación entre los resultados obtenidos en diferentes periodos de incubación varió desde 0,62-0,89 (media, 0,79).

La correlación entre ambos métodos fue inferior. La correlación ( $r$  de Spearman) media entre la microdilución 20h, la microdilución 24h y la microdilución 48h con la dilución en agar 20h fue de 0,69, 0,65 y 0,62, con la dilución en agar 24h de 0,68, 0,65, 0,65 y con la dilución en agar 48h 0,70, 0,67, 0,65.

**Tabla 17.** Valor del estadístico  $p$  en el test  $\chi^2$  al comparar la distribución de la población en categorías de sensibilidad entre los periodos de incubación señalados.

Quinolona	Método dilución en agar			Método microdilución en caldo		
	20-24 h	20-48 h	24-48 h	20-24 h	20-48 h	24-48 h
Nalidíxico	-	-	-	<b>0,0031</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0001</b>
Ciprofloxacino	-	-	-	-	<b>0,0001</b>	<b>0,0002</b>
Levofloxacino	-	-	-	-	<b>0,0001</b>	<b>0,0059</b>
Moxifloxacino	-	-	-	-	<b>0,0001</b>	<b>0,0008</b>
Gatifloxacino	-	-	-	-	<b>0,0002</b>	-
Clinafloxacino	-	-	-	-	<b>0,0001</b>	-

**Tabla 18.** Valor del estadístico  $p$  en el test  $\chi^2$  al comparar la distribución de la población en categorías de sensibilidad entre ambos métodos a los periodos de incubación señalados.

Quinolona	Extensión de la incubación en la prueba de sensibilidad		
	20h	24 h	48 h
Nalidíxico	0,011	-	< 0,0001
Ciprofloxacino	0,0040	-	0,0108
Levofloxacino	-	-	0,0477
Moxifloxacino	-	-	-
Gatifloxacino	-	-	-
Clinafloxacino	-	-	0,037

Las CMI de las cepas de referencia y aislados clínicos de *A. baumannii* o *P. aeruginosa* empleadas de control, se situaron dentro del intervalo de  $\pm 1 \log_2$  la obtenida bajo las condiciones estándar, independientemente del método o de la extensión de la prueba de incubación.



**Tabla 19.** Correlación en los resultados obtenidos por ambos métodos de sensibilidad

Quinolona	Método (tiempo incubación)	Dilución agar		Microdilución en caldo		
		24h	48h	20h	24h	48h
Acido nalidíxico	Agar (20h)	0,85	0,81	0,77	0,70	0,72
	Agar (24h)		0,88	0,75	0,69	0,74
	Agar (48h)			0,75	0,69	0,72
	Microdilución (20h)				0,75	0,77
	Microdilución (24h)					0,76
Ciprofloxacino	Agar (20h)	0,97	0,91	0,71	0,73	0,62
	Agar (24h)		0,92	0,69	0,70	0,60
	Agar (48h)			0,71	0,73	0,67
	Microdilución (18h)				0,86	0,62
	Microdilución (24h)					0,67
Levofloxacino	Agar (20h)	0,87	0,88	0,65	0,60	0,70
	Agar (24h)		0,90	0,58	0,54	0,68
	Agar (48h)			0,66	0,62	0,65
	Microdilución (20h)				0,80	0,68
	Microdilución (24h)					0,77
Moxifloxacino	Agar (20h)	0,96	0,91	0,61	0,66	0,64
	Agar (24h)		0,92	0,60	0,65	0,67
	Agar (48h)			0,66	0,72	0,70
	Microdilución (20h)				0,89	0,82
	Microdilución (24h)					0,87
Gatifloxacino	Agar (20h)	0,94	0,93	0,86	0,85	0,77
	Agar (24h)		0,96	0,83	0,83	0,78
	Agar (48h)			0,81	0,82	0,76
	Microdilución (20h)				0,89	0,82
	Microdilución (24h)					0,86
Clinafloxacino	Agar (20h)	0,91	0,90	0,55	0,37	0,29
	Agar (24h)		0,91	0,64	0,48	0,45
	Agar (48h)			0,61	0,46	0,40
	Microdilución (20h)				0,80	0,79
	Microdilución (24h)					0,82

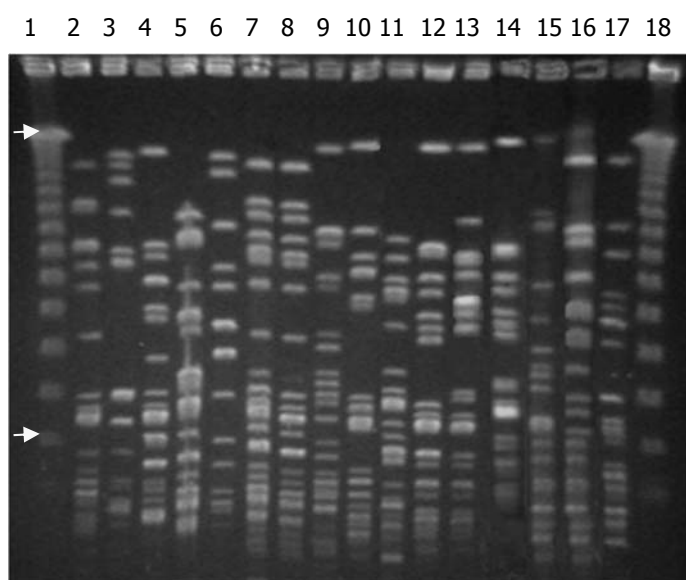
### 4.3 Farmacodinámica de levofloxacin, moxifloxacin y gatifloxacin frente a *S. maltophilia* en un sistema dinámico *in vitro* de microfiltración

Las cepas clínicas utilizadas en este apartado se recogen en la tabla 20. Las cepas presentaron una CMI creciente a ciprofloxacino dentro de un intervalo de concentraciones comprendido entre 0,25-8 µg/ml, concentraciones de interés clínico que potencialmente se alcanzan con dosis convencionales de ciprofloxacino. Cepas con idéntica CMI exhibieron un fenotipo de resistencia variable a cotrimoxazol y ticarcilina-ácido clavulánico. De acuerdo a los fragmentos de restricción con *Xba*I generados mediante PFGE, las cepas no estuvieron genéticamente relacionadas entre sí (figura 20).

**Tabla 20.** Sensibilidad (dilución en agar) de los aislados clínicos de *S. maltophilia* estudiados

Cepa	CMI (µg/ml) <sup>a</sup>					
	Ciprofloxacino	Levofloxacino	Moxifloxacino	Gatifloxacino	Cotrimoxazol	TIC/CLAV
Sma9	8/8	4/4	2/2	8/8	64/64	64/128
Sma15	8/8	4/4	2/2	4/4	128/128	32/32
Sma52	4/8	2/2	1/2	2/4	2/2	8/16
Sma19	4/4	4/4	1/1	4/4	32/32	16/32
Sma48	4/4	2/2	0,5/1	2/2	0,5/0,5	8/16
Sma27	2/2	0,5/0,5	0,12	0,5/0,5	2/2	64/128
Sma46	2/2	0,5/1	0,25/1	0,5/1	1/1	16/32
Sma51	2/2	1/1	0,25/0,25	0,5/1	4/4	32/32
Sma71	2/2	0,5/1	0,25/0,25	0,5/1	1/1	64/64
Sma80	2/2	0,5/1	0,25/0,5	0,5/1	0,25/0,25	128/128
Sma24	1/2	1/2	0,25/0,5	1/1	2/2	32/32
Sma18	1/1	0,5/0,5	0,12/0,12	0,25/0,5	2/2	128/128
Sma28	1/1	0,25/0,25	0,06/0,06	0,125	0,5/0,5	64/128
Sma81	1/1	1/1	0,25/0,25	0,5/1	0,5/0,5	128/128
SmaATCC	0,5/1	0,25/0,25	0,06/0,06	0,12	2/2	4/4
Sma22	0,25	0,12/0,12	0,03/0,03	0,06/0,12	2/2	32/32

<sup>a</sup> CMI 24h/48h TIC/CLAV. Ticarcilina-ácido clavulánico



**Figura 20.** PFGE de las cepas de *S. maltophilia* seleccionadas. 1,18; marcadores de peso molecular, 2; Sma9, 3; Sma15, 4; Sma18, 5; Sma19, 6; Sma22, 7; Sma24, 8; Sma27, 9; Sma28, 10; Sma46, 11; Sma48, 12; Sma51, 13; Sma52, 14; Sma71, 15; Sma80, 16; Sma81 17; SmaATCC. Las flechas indican 727 Kpb (arriba) y 48 Kpb (abajo) respectivamente.

### 4.3.1 Farmacocinética

Las concentraciones de levofloxacin, moxifloxacin y gatifloxacin que se expusieron al microorganismo con el sistema de microfiltración, han sido detalladas con anterioridad en la tabla 5. La farmacocinética reproducida *in vitro* mediante la incorporación sucesiva de las diferentes concentraciones, en los intervalos referidos, se representó en la figura 12 frente a la farmacocinética sugerida en humanos. Como se muestra en la tabla 21, los parámetros farmacocinéticos,  $AUC_{0-24}$  y  $C_{max}$  calculados para las tres quinolonas no fueron significativamente diferentes de los valores diana buscados, calculados a partir de los datos combinados de varios estudios.

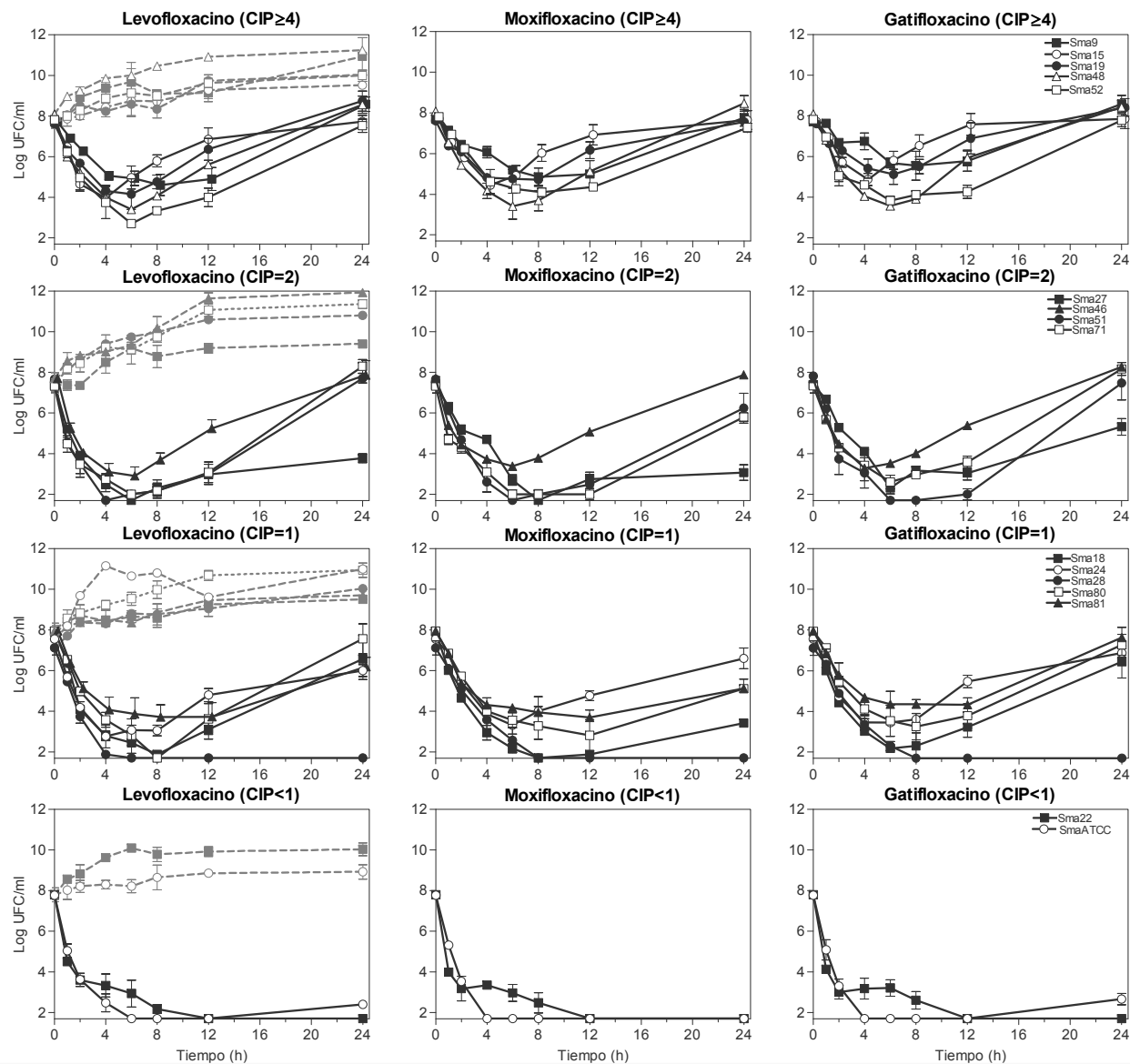
**Tabla 21.** Parámetros farmacocinéticos reproducidos con el sistema *in vitro*

Antimicrobiano/dosis	Parámetros farmacocinéticos			
	$AUC_{0-24}$ ( $\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$ )		$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	
Levofloxacin/ 500 mg	44,75	(44,15)	5,12	(5,37)
Moxifloxacin/400 mg	25,94	(25,81)	2,32	(2,50)
Gatifloxacin/400 mg	30,34	(30,27)	3,60	(3,60)

( ); valores buscados, calculados a partir de datos combinados de varios estudios farmacocinéticos

### 4.3.2 Curvas de muerte bacteriana

La evolución del recuento de viables de las cepas de *S. maltophilia* expuestas a dosis únicas de levofloxacin 500 mg, moxifloxacin 400 mg o gatifloxacin 400 mg y de sus respectivos controles de crecimiento se representa en la figura 21. Como se observa en la figura el recuento de células viables en las curvas control (simulaciones libres de antimicrobiano) aumentó progresivamente entre los tiempos 0 y 24 horas. En cambio en las curvas tratadas con fluorquinolona (simulaciones con fluorquinolona) la rápida y pronunciada disminución de microorganismos viables conseguida en las primeras horas, fue seguida en la mayoría de los casos, de fuertes recrecimientos de intensidad proporcional a los descensos previos. Los recrecimientos fueron habituales entre cepas con una  $CMICIP \geq 1 \mu\text{g/ml}$  (exceptuando Sma28) y en proporción más acusados cuanto más pronunciada (mayor  $r_{max}$ ) fue la respuesta antibacteriana durante las primeras horas de exposición (figura 21- $CMICIP = 1-2 \mu\text{g/ml}$ ). En algún caso el recrecimiento de bacterias se observó incluso después de un periodo de tiempo con recuentos por debajo del límite de detección. Comparativamente los recrecimientos fueron menos intensos con moxifloxacin y en especial entre las cepas con una  $CMICIP = 1-2 \mu\text{g/ml}$ . Tan solo tres cepas con moxifloxacin y dos con levofloxacin o gatifloxacin consiguieron ser erradicadas.



**Figura 21.** Evolución del recuento de microorganismos viables en las simulaciones con levofloxacin, moxifloxacin, o gatifloxacin (línea continua) y en las simulaciones libres de antimicrobiano (línea discontinua)

El efecto antibacteriano de las tres fluorquinolonas frente a *S. maltophilia* se compara en las tablas 22, 23 y 24, donde las cepas fueron agrupadas de acuerdo a la sensibilidad a ciprofloxacino. Como se aprecia en las tablas, el efecto antibacteriano aumentó, aumento de las medidas del efecto r24h, RII y rmax y disminución del AUBKC o T<sub>99,9</sub>, conforme disminuyó la CMI<sub>CIP</sub> del microorganismo. Este efecto fue significativamente diferente en las cepas de menor sensibilidad (CMI<sub>CIP</sub> <1 µg/ml).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el efecto antibacteriano medio de las tres fluorquinolonas en los diferentes grupos de sensibilidad, aunque moxifloxacino presentó respuestas antibacterianas superiores, mayor r24h y RII y menor AUBKC, en comparación con levofloxacino o gatifloxacino y especialmente en las cepas con una CMI<sub>CIP</sub> ≤2 µg/ml.

**Tabla 22.** Medida del efecto antimicrobiano de levofloxacino frente a *S. maltophilia* de acuerdo a la sensibilidad a ciprofloxacino.

CMI <sub>CIP</sub> (µg/ml)	r24h (log UFC/ml)	rmax (log UFC/ml)	AUBKC (log UFC/ml·h)	T <sub>99,9</sub> (h)	RII (%)
>4	0,4±0,6	-4,0±0,8	101,5±14,7	2,7±0,5	-480,8±616,4
2	-0,6±1,8	-5,6±0,6	62,5±18,5	1,5±0,5	-178,9±398,4
1	-2,5±1,9 <sup>a</sup>	-5,1±0,8	52,0±28,8 <sup>a</sup>	1,9±0,4	96,5±3,8
<1	-5,7±0,5 <sup>a,b</sup>	-6,1±0,0	15,6±0,6 <sup>a,b</sup>	1,1±0,3 <sup>a</sup>	>99,9

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs. CMI<sub>CIP</sub>>4. <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs. CMI<sub>CIP</sub>=2

**Tabla 23.** Medida del efecto antimicrobiano de moxifloxacino frente a *S. maltophilia* de acuerdo a la sensibilidad a ciprofloxacino.

CMI <sub>CIP</sub> (µg/ml)	r24h (log UFC/ml)	rmax (log UFC/ml)	AUBKC (log UFC/ml·h)	T <sub>99,9</sub> (h)	RII (%)
>4	0,0±0,3	-3,5±0,7	102,3±10,7	3,5±0,6	-27,6±93,3
2	-2,0±1,7	-5,3±0,6	54,5±20,5 <sup>a</sup>	2,5±0,9	66,9±68,8
1	-3,4±2,0 <sup>a</sup>	-5,0±1,0	48,7±31,0 <sup>a</sup>	2,8±0,7	96,6±6,7
<1	-6,1±0,0 <sup>a,b</sup>	-6,1±0,0	12,8±4,5 <sup>a</sup>	1,1±0,4 <sup>a</sup>	>99,9

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs. CMI<sub>CIP</sub>>4. <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs. CMI<sub>CIP</sub>=2

**Tabla 24.** Medida del efecto antibacteriano de gatifloxacino frente a *S. maltophilia* de acuerdo a la sensibilidad a ciprofloxacino

CMI <sub>CIP</sub> (µg/ml)	r24h (log UFC/ml)	rmax (log UFC/ml)	AUBKC (log UFC/ml·h)	T <sub>99,9</sub> (h)	RII (%)
>4	0,4±0,4	-3,2±1,0	112,3±16,4	2,7±0,4	-316,7±341,0
2	-0,3±1,2	-5,0±0,7	70,4±17,4	2,4±0,8	-157,8±315,7
1	-2,0±2,3	-4,8±1,0	62,8±34,0 <sup>a</sup>	2,7±0,7	77,6±28,7
<1	-5,6±0,7 <sup>a,b,c</sup>	-6,1±0,0	15,5±1,1 <sup>a,b</sup>	1,0±0,3	>99,9

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs. CMI<sub>CIP</sub>>4. <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs. CMI<sub>CIP</sub>=2. <sup>c</sup>  $p < 0.05$  vs. CMI<sub>CIP</sub>=1

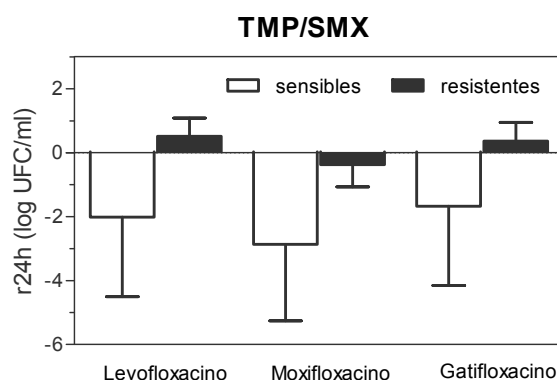
Tampoco se encontraron diferencias significativas en el r24h y el AUBKC medio calculado para las cepas agrupadas de acuerdo a la sensibilidad a ticarcilina-ácido clavulánico (tabla 25).

El efecto antibacteriano r24h y AUBKC, en cambio frente a las cepas sensibles y resistentes a cotrimoxazol si fue marcadamente diferente y estas diferencias fueron estadísticamente significativas (r24h,  $p < 0.05$  t-test) con levofloxacino y moxifloxacino (figura 22).

**Tabla 25.** Actividad de las fluorquinolonas en cepas resistentes a ticarcilina-ácido clavulánico

	r24h (log UFC/ml)			AUBKC (log UFC/ml·h)		
	CMI <sub>T/C</sub> (µg/ml)			CMI <sub>T/C</sub>		
	≤16/2 sensible	32/2-64/2 intermedia	≥128/2 resistente	≤16/2 sensible	32/2-64/2 intermedia	≥128/2 resistente
Levofloxacin	-0,8±2,6	-2,2±2,8	-0,6±1,2	78,4±37,8	58,1±40,5	65,1±6,9
Moxifloxacin	-1,2±2,7	-2,5±2,4	-3,4±1,0	77,9±38,9	57,9±38,4	50,6±20,8
Gatifloxacin	-0,7±2,5	-1,6±2,7	-0,4±1,0	84,5±41,1	68,5±42,0	75,3±16,5

T/C; ticarcilina/clavulánico (2 µg/ml). 3 cepas fueron sensibles, 8 intermedias y 5 resistentes



**Figura 22.** Efecto antibacteriano de las fluorquinolonas (r24h) frente a las cepas sensibles y resistentes a cotrimoxazol.

En ambos grupos de cepas el efecto antimicrobiano medio, r24h y AUBKC, fue de -2,0 vs. 0,5 y 56,0 vs. 96,8 para levofloxacin, de -2,9 vs. -0,4 y 52,4 vs. 93,8 para moxifloxacin y de -1,7 vs. 0,4 y 64,6 vs. 105,2 para gatifloxacin.

#### 4.3.3 Relación entre el efecto antibacteriano, y los parámetros farmacodinámicos CMI, AUC/CMI y T<sub>>CMI</sub> de levofloxacin, moxifloxacin y gatifloxacin

La relación entre la CMI, AUC/CMI, t<sub>>CMI</sub> y las diferentes medidas del efecto antibacteriano, r24h, AUBKC, r<sub>max</sub>, T<sub>99,9</sub> y RII se resumen en las tablas 26, 27 y 28. Las tres variables FC/FD estuvieron estrechamente relacionadas entre sí, de manera que, cuando la CMI disminuyó, aumentó el cociente AUC/CMI o el T<sub>>CMI</sub> expuesto al microorganismo y aumentó el efecto antibacteriano (aumento de las r24h y RII y disminución del AUBKC o T<sub>99,9</sub>) de cada fluorquinolona.

El ajuste de los datos mediante modelos sigmoideos de dosis-respuesta, indicó que esta variación en el AUC/CMI (logAUC/CMI) se correlacionó fuertemente con la variación del efecto antibacteriano en forma de r24h ( $r^2 > 0,85$ ), AUBKC ( $r^2 > 0,83$ ) o r<sub>max</sub> ( $r^2 > 0,71$ ) (figura 23). En cambio, el ajuste fue más pobre con la CMI (logCMI),  $r^2 < 0,7$  y muy débil con el T<sub>>CMI</sub> (logT<sub>>CMI</sub>),  $r^2 < 0,4$ . El efecto antibacteriano en forma de T<sub>99,9</sub> o RII no se correlacionó con ninguna de las variables sugeridas. La correlación entre la CMI, AUC/CMI y T<sub>>CMI</sub> y las medidas de efecto antibacteriano fue similar cuando las quinolonas se trataron individualmente aunque con diferencias en el ajuste de los datos según la quinolona analizada. En general estos fueron más fuertes con moxifloxacin (figura 24)

**Tabla 26.** Análisis de la relación entre los parámetros farmacodinámicos y las medidas del efecto antibacteriano de levofloxacin

CMI <sub>LEV</sub> <sup>*</sup>	n	AUC/CMI (h)	T <sub>&gt;CMI</sub> (h)	r24h (log UFC/ml)	rmax (log UFC /ml)	AUBKC (log UFC /ml,h)	T <sub>99,9</sub> (h)	RII (%)
4	3	11,2	10,4	0,7±0,6	-3,5±0,3	109,9±5,1	3,0±0,7	-724,9±717,8
2	3	22,4	39,6	-0,4±1,0	-4,9±0,2 <sup>d</sup>	82,7±15,9	2,2±0,4	-44,1±190,0
1	5	44,8	66,6	-0,2±1,0	-5,3±0,8 <sup>d</sup>	69,6±11,1 <sup>d</sup>	1,6±0,6 <sup>d</sup>	-179,4±398,1
0,5	2	89,5	100,0	-2,5±1,6	-5,9±0,2 <sup>d</sup>	46,0±14,4 <sup>c</sup>	1,6±0,0 <sup>d</sup>	95,5±6,3 <sup>b</sup>
0,25	2	179,0	100,0	-5,4±0,0 <sup>a</sup>	-5,7±0,5 <sup>d</sup>	12,7±3,6 <sup>a</sup>	1,6±0,3 <sup>d</sup>	>99,9 <sup>a</sup>
0,125	1	358,0	100,0	-6,1 <sup>a</sup>	-6,1 <sup>c</sup>	16,1 <sup>a</sup>	0,9 <sup>c</sup>	>99,9 <sup>a</sup>

\*CMI a las 48h (µg/ml). AUC/CMI y T<sub>>CMI</sub> calculados con la CMI de 48h

<sup>a</sup>p<0,05 vs. CMI<sub>LEV</sub>≥0,5. <sup>b</sup>p<0,05 vs. CMI<sub>LEV</sub>≥1. <sup>c</sup>p<0,05 vs. CMI<sub>LEV</sub>≥2. <sup>d</sup>p>0,05 vs. CMI<sub>LEV</sub>≥4

**Tabla 27.** Análisis de la relación entre los parámetros farmacodinámicos y las medidas del efecto antibacteriano de moxifloxacin

CMI <sub>MOX</sub>	n	AUC/CMI (h)	T <sub>&gt;CMI</sub> (h)	r24h (log UFC /ml)	rmax (log UFC /ml)	AUBKC (log UFC /ml,h)	T <sub>99,9</sub> (h)	RII (%)
2	3	12,9	4,2	-0,2±0,3	-3,3±0,4	102,9±14,2	3,8±0,4	12,4±51,9
1	3	25,9	47,9	0,2±0,2	-4,0±0,9	97,3±9,0	2,2±0,8	-77,1±95,1
0,5	2	51,8	100	-1,9±1,3 <sup>c</sup>	-4,7±0,6 <sup>d</sup>	69,6±17,9 <sup>d</sup>	3,1±0,2	93,2±9,4 <sup>c</sup>
0,25	3	103,6	100	-1,9±0,8 <sup>c</sup>	-5,2±0,9 <sup>d</sup>	52,3±13,6 <sup>c</sup>	2,4±0,5	96,9±3,1 <sup>c</sup>
0,125	2	207,2	100	-4,4±0,1 <sup>a</sup>	-5,9±0,4 <sup>b</sup>	32,4±7,2 <sup>a</sup>	2,8±1,4	>99,9 <sup>c</sup>
0,06	2	431,7	100	-5,7±0,5 <sup>a</sup>	-5,7±0,5 <sup>b</sup>	13,7±5,8 <sup>a</sup>	2,3±1,4	>99,9 <sup>c</sup>
0,03	1	863,3	100	-6,1 <sup>a</sup>	-6,1 <sup>b</sup>	15,9 <sup>a</sup>	0,8	>99,9 <sup>c</sup>

\*CMI a las 48h (µg/ml). AUC/CMI y T<sub>>CMI</sub> calculados con la CMI de 48h

<sup>a</sup>p<0,05 vs. CMI<sub>MOX</sub>≥0,25. <sup>b</sup>p<0,05 vs. CMI<sub>MOX</sub>≥0,5. <sup>c</sup>p<0,05 vs. CMI<sub>MOX</sub>≥1. <sup>d</sup>p<0,05 vs. CMI<sub>MOX</sub>≥2.

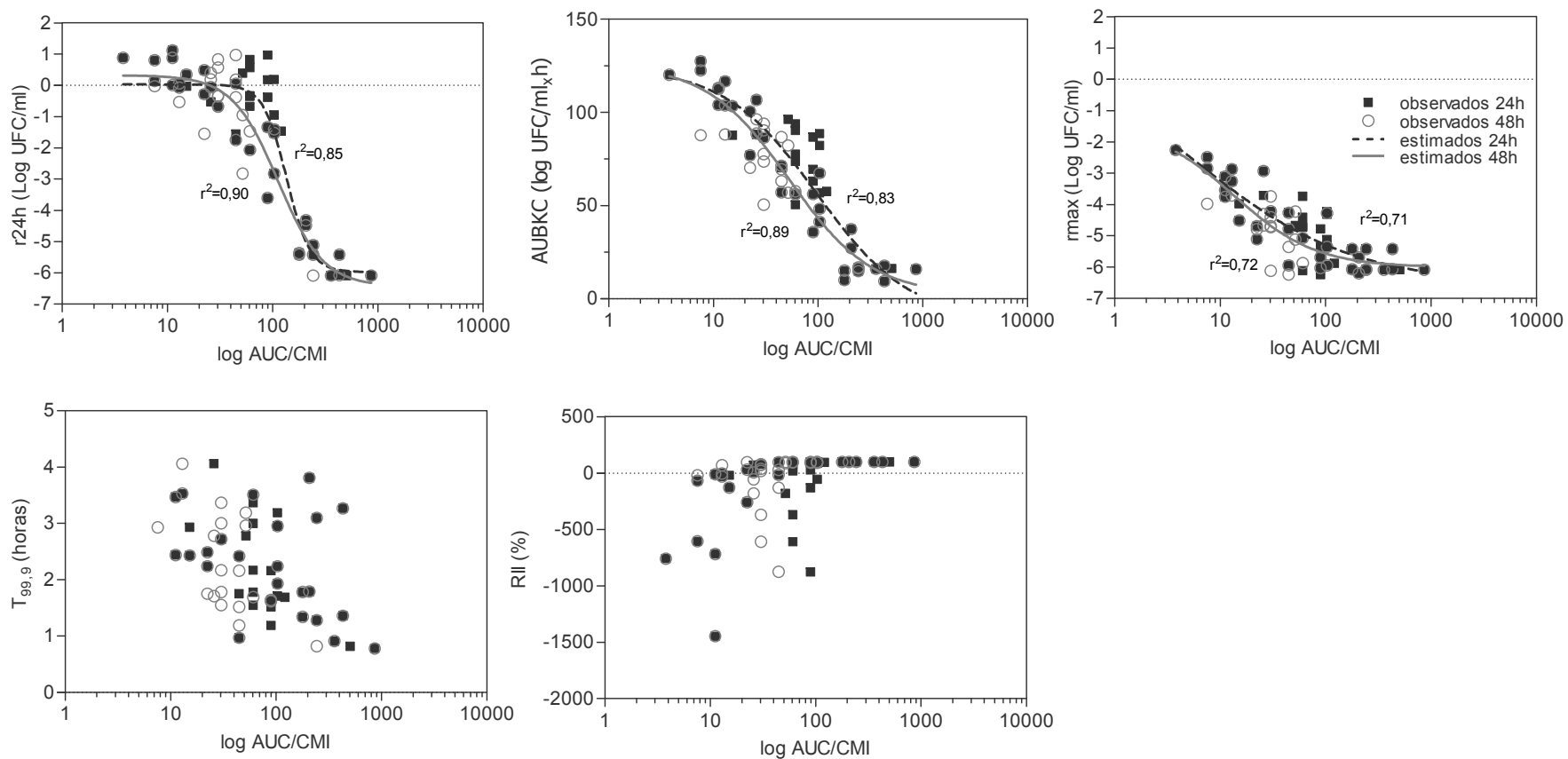
**Tabla 28.** Análisis de la relación entre los parámetros farmacodinámicos y las medidas del efecto antibacteriano de gatifloxacin

CMI <sub>GAT</sub> <sup>*</sup>	n	AUC/CMI (h)	T <sub>&gt;CMI</sub> (h)	r24h (log UFC /ml)	rmax (log UFC /ml)	AUBKC (log UFC /ml,h)	T <sub>99,9</sub> (h)	RII (%)
8	1	3,8	0	0,9	-2,3	120,2	>24	-759,9
4	3	7,6	0	0,3±0,4	-3,1±0,8	112,6±21,6	17,0±12,2	-231,6±325,2
2	1	15,2	22,9	0,3	-4,5 <sup>d</sup>	103,4	2,4 <sup>d</sup>	-128,5
1	6	30,3	47,9	-0,1±0,6	-4,7±0,8 <sup>c</sup>	78,8±15,8 <sup>b</sup>	2,4±0,7 <sup>d</sup>	-128,8±290,3
0,5	2	60,7	100	-1,8±0,4 <sup>b</sup>	-5,5±0,6 <sup>c</sup>	57,0±1,0 <sup>b</sup>	2,6±1,3 <sup>d</sup>	97,0±3,0 <sup>b</sup>
0,125	3	242,7	100	-5,5±0,5 <sup>a</sup>	-5,9±0,4 <sup>c</sup>	16,0±1,1 <sup>a</sup>	1,7±1,2 <sup>d</sup>	>99,9 <sup>b</sup>

\*CMI a las 48h (µg/ml). AUC/CMI y T<sub>>CMI</sub> calculados con la CMI de 48h

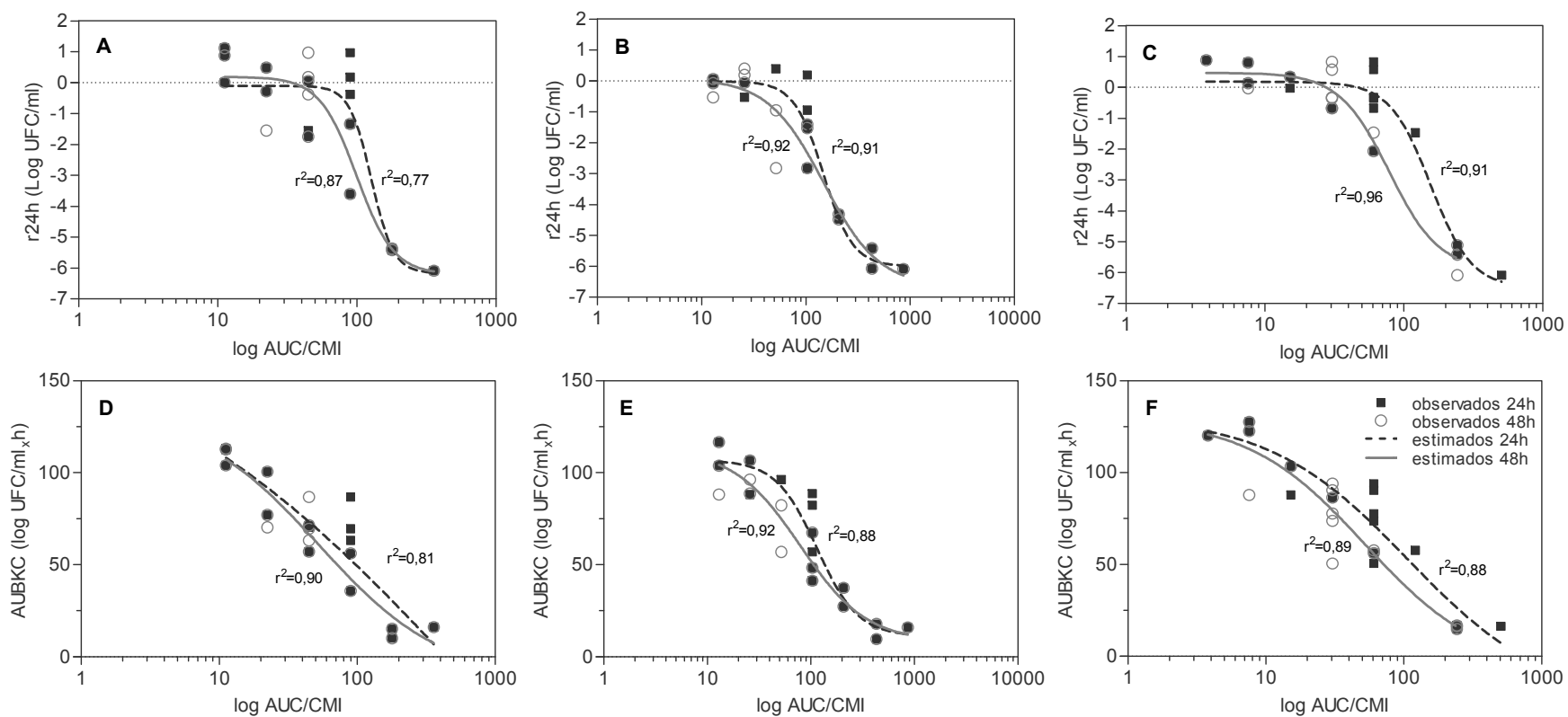
<sup>a</sup>p<0,05 vs. CMI<sub>GAT</sub>≥0,5. <sup>b</sup>p<0,05 vs. CMI<sub>GAT</sub>≥1. <sup>c</sup>p<0,05 vs. CMI<sub>GAT</sub>≥2. <sup>d</sup>p>0,05 vs. CMI<sub>GAT</sub>≥4

Como se observa en ambas figuras, (23 y 24), las curvas dosis-respuesta generadas a partir de los valores de CMI de 24 o 48 horas fueron completamente diferentes. Con la CMI de 48 horas las curvas se desplazaron hacia la izquierda del eje de ordenadas en respuesta al aumento de CMI, disminución del AUC/CMI, obtenido al prolongar la incubación de la prueba de sensibilidad. La distancia entre ambas curvas fue mayor conforme aumentó el número de cepas con cambios en estos valores de CMI (observar que en la figura 24, las curvas para moxifloxacin, que exhibió menos cambios en la CMI que levofloxacin o gatifloxacin con el aumento del tiempo de incubación, presentan menos solapamiento).



**Figura 23.** Relación entre el efecto antibacteriano de las fluorquinolonas ( $r_{24h}$ , AUBKC,  $r_{max}$ ,  $T_{99,9}$ , RII) y el cociente AUC/CMI expuesto





**Figura 24.** Relación entre el efecto antibacteriano (r24h o AUBKC) y el cociente AUC/CMI de levofloxacin (A, D), moxifloxacin (B, E) y gatifloxacin (C, F)

El ajuste de las medidas de efecto antibacteriano para las quinolonas tratadas en conjunto o de manera individual, fue superior cuando las variables FC/FD y en particular el AUC/CMI dependieron de la CMI obtenida a las 48 horas. De acuerdo a este valor de CMI de 48 horas y tal y como se refiere en la tablas 26-28, la respuesta antibacteriana de las tres fluorquinolonas fue marcadamente diferente (y significativamente diferente en muchas de las comparaciones establecidas) cuando la CMI del microorganismo fue  $<1 \mu\text{g/ml}$  o el AUC/CMI expuesto superó las 50 horas. En concreto un cociente AUC/CMI  $\geq 89,5$ ,  $\geq 51,8$  y  $\geq 60,7$  horas, para levofloxacin, moxifloxacin y gatifloxacin respectivamente (o una CMI equivalente  $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ ) originó reducciones del inóculo inicial a las 24 horas (r24h) próximas a las 2 unidades logarítmicas y un AUBKC de entre 46 y 69 log UFC/ml.h. Con exposiciones inferiores a 50 horas (cepas con una CMI  $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ ) la reducción r24h fue inferior a los 0,2-log UFC/ml y el AUBKC superior a 69 log UFC/ml.h. Hay que resaltar que este criterio (CMI  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$  o AUC/CMI  $\approx 50\text{h}$ ) se cumplió en 10 cepas con moxifloxacin por tan solo 5 con levofloxacin y gatifloxacin.

#### 4.3.4 Influencia del método de sensibilidad y de las variaciones del método en el ajuste dosis-respuesta de las fluorquinolonas en *S. maltophilia*

La influencia del método de sensibilidad en el ajuste se valoró empleando el AUC/CMI como parámetro FC/FD principal y el AUBKC como media del efecto antibacteriano.

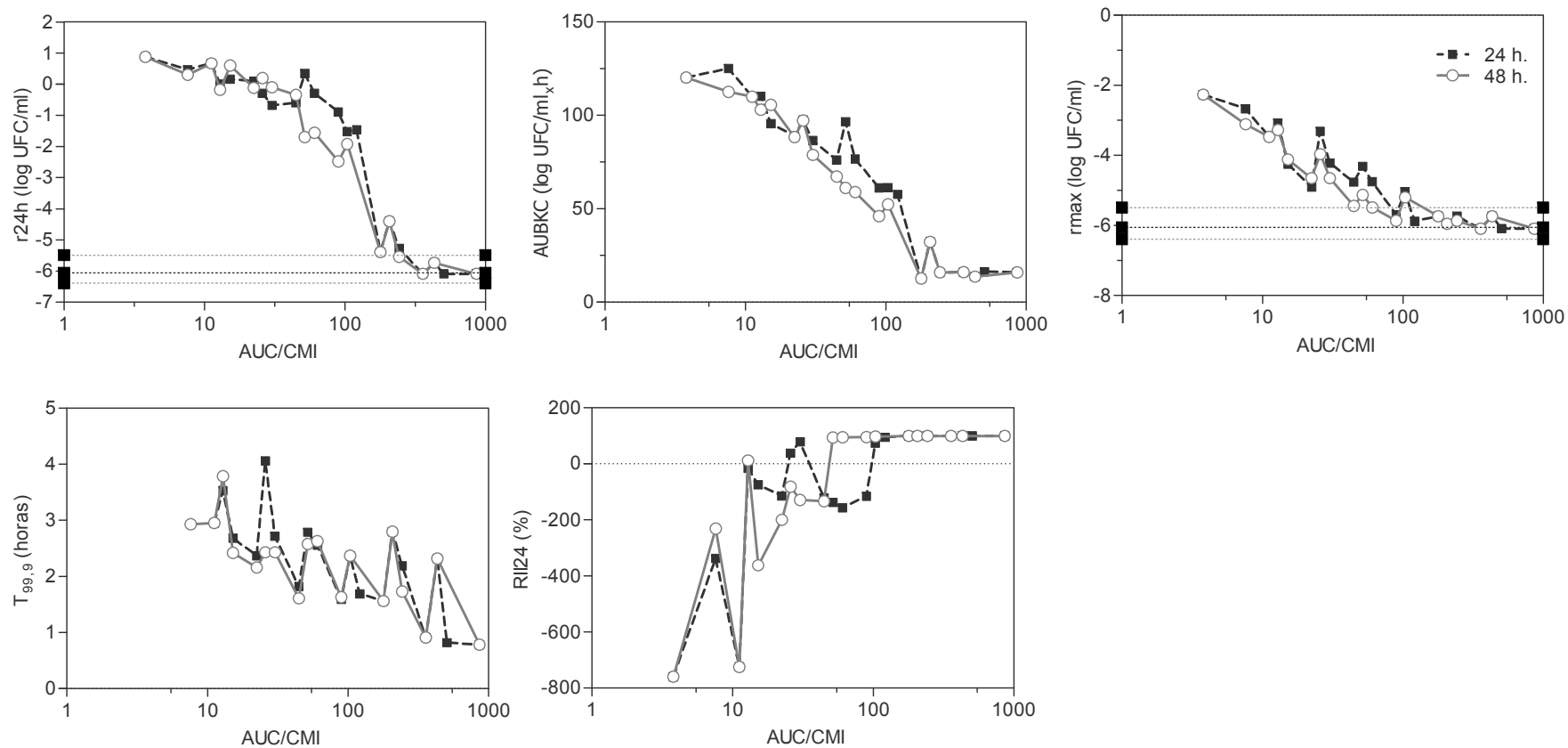
El AUBKC se seleccionó por ser la medida más reproducible y menos variable (tabla 29) y más regular y sensible frente a las variaciones del AUC/CMI expuesto (figura 25), de las tres medidas que mejor se correlacionaron con el AUC/CMI (figura 23).

Como se muestra en la tabla 29, el AUBKC se cuantificó en todos los experimentos (n=48) y presentó una variabilidad reducida, 10%, en repeticiones sucesivas del mismo experimento. El efecto antibacteriano con otras medidas como r24h, rmax o  $T_{99,9}$  no pudo ser cuantificado en todos los experimentos, 7, 16 y 6 respectivamente (se adoptó el valor del límite de detección como base de cálculo; 1,7-log UFC/ml para r24h o rmax o 24 horas para  $T_{99,9}$ ) o, presentó una variabilidad superior al AUBKC.

**Tabla 29.** Reproducibilidad y variación (coeficiente de variación, %) de las medidas del efecto antibacteriano a fluorquinolonas en *S. maltophilia*

Medida de actividad	Nº casos donde se determinó el %CV	%CV		
		Mediana	Media	Rango (min-max)
r24h	41	37,1	181,7	0,3-1947
rmax	32	7,3	7,5	0,1-20,7
$T_{99,9\%}$	42	5,5	10,4	0-45,7
RII	48	17,0	163,6	0,0-3020
AUBKC	48	10,3	12,5	2,69-23,6

Como se representa en la figura 25, el AUBKC, o la r24h, fueron medidas muy regulares y sensibles frente a las variaciones del AUC<sub>0-24</sub>/CMI expuesto, lo que contrasta con el patrón errático, irregular y menos sensible de medidas como  $T_{99,9\%}$  o RII.



**Figura 25.** Regularidad y sensibilidad de las medidas del efecto antibacteriano a los cambios del índice FC/FD. Límite de detección medio (línea punteada negra) y límite de detección máximo y mínimo (líneas punteadas grises)

Mientras que incrementos de aproximadamente 300 veces en el AUC/CMI ocasionaron una variación de la respuesta en forma de  $r_{24h}$  o AUBKC de entre 8-10 veces, las respuestas en forma de  $T_{99,9\%}$  variaron menos de 4 veces o de 3 veces en el caso de  $r_{max}$ . La RII fue muy sensible para las respuestas que indicaron recrecimiento por encima del inóculo inicial o no actividad (la respuesta varió 10 veces en un intervalo de AUC/CMI de 100 h), y relativamente insensible para la mayoría de respuestas que indicaron reducción del inóculo inicial (las respuestas de exposiciones de aproximadamente 900 h variaron 1,1 veces). Esta falta de sensibilidad tiene su origen en la variación exponencial de la RII que tiende a concentrar las respuestas conforme aumenta el AUC/CMI. Este efecto de concentración es también común en las medidas menos reproducibles ( $r_{24h}$ ,  $r_{max}$  o  $T_{99,9\%}$ ) al adoptar el valor del límite de detección superado un determinado AUC/CMI.

Como se puede apreciar en la tabla 30, el ajuste dosis-respuesta entre el AUC/CMI y el AUBKC varió notablemente con la variación de la sensibilidad dependiente del método (tabla 20 y tabla 31).

**Tabla 30.** Dependencia metodológica de la relación entre el efecto antibacteriano de las fluorquinolonas y el índice FC/FD y probabilidad relativa de la eficacia en el pronóstico

Método sensibilidad (tiempo incubación)	Levofloxacin		Moxifloxacin		Gatifloxacin	
	$r^2$ (CIA) <sup>a</sup>	$P$ relativa <sup>b</sup>	$r^2$ (CIA) <sup>a</sup>	$P$ relativa <sup>b</sup>	$r^2$ (CIA) <sup>a</sup>	$P$ relativa <sup>b</sup>
Dilución agar (24)	0,81 (164,9)	95,9	0,88 (156,6)	21,2	0,88 (164,8)	170,0
Dilución agar (48)	0,90 (155,8)	R	0,92 (150,5)	R	0,89 (154,5)	R
Microdilución (24)	0,76 (169,7)	1.036,0	0,81 (167,7)	13.140,9	0,72 (172,8)	9.357,3
Microdilución (48)	0,75 (170,2)	1.391,6	0,74 (170,6)	54.077,8	0,76 (170,2)	2.640,0
E-test (24)	0,65 (172,9)	5.310,0	0,75 (169,6)	32.831,9	0,75 (170,8)	3.458,0
E-test (48)	0,70 (170,9)	1.905,2	0,72 (171,8)	99.315,3	0,78 (168,9)	1.357,0

<sup>a</sup> Criterio informativo de Akaike

<sup>b</sup> Probabilidad relativa;  $P$  método referencia/ $P$  método

R; método de referencia de acuerdo a la fortaleza del ajuste y el valor CIA

**Tabla 31.** Sensibilidad levofloxacin, moxifloxacin y gatifloxacin mediante microdilución en caldo y E-test de las cepas estudiadas en el sistema de microfiltración.

Cepa	Levofloxacin		Moxifloxacin		Gatifloxacin	
	Microd.	E-test	Microd.	E-test	Microd.	E-test
Sma9	4/4	1/1,5	1/2	0,38/0,38	4/8	0,38/0,38
Sma15	2/4	2/3	0,5/2	0,5/0,5	8/16	1/1
Sma52	8/16	1,5/2	2/4	0,5/0,5	4/4	0,75/0,75
Sma19	1/4	1,5/3	0,5/1	0,5/0,5	2/8	0,38/0,38
Sma48	4/8	0,5/0,75	2/2	0,25/0,25	2/2	0,12/1
Sma27	0,25/2	0,75/1	0,02/0,06	0,094/0,094	1/1	0,12/0,12
Sma46	2/2	0,5/0,75	0,5/1	0,094/0,12	2/2	0,12/0,12
Sma51	1/2	0,38/0,5	0,25/0,25	0,12/0,19	0,5/0,5	0,094/0,094
Sma71	0,5/2	0,50,5	0,125/0,5	0,12/0,12	1/1	0,12/0,12
Sma80	0,5/1	0,25/0,5	0,25/0,25	0,094/0,094	0,5/1	0,19/0,19
Sma24	0,5/4	0,75/1	0,06/0,5	0,25/0,25	2/2	0,12/0,12
Sma18	0,25/0,5	0,19/0,19	0,02/0,12	0,094/0,125	0,25/1	0,06/0,06
Sma28	0,5/1	0,25/0,38	0,03/0,5	0,19/0,25	0,5/0,5	0,094/0,094
Sma81	0,25/4	0,12/0,12	0,12/2	0,25/0,25	0,12/2	0,5/0,5
SmaATCC	0,5/2	0,25/0,25	0,06/0,12	0,016/0,023	1/2	0,03/0,03
Sma22	0,03/0,03	0,06/0,06	0,03/0,03	0,016/0,016	0,06/0,06	0,016/0,016

<sup>a</sup> CMI 24h/48h Microd.; microdilución en caldo

Si comparamos ambas tablas las diferencias fueron muy marcadas especialmente para levofloxacino y gatifloxacino frente a las cepas menos sensibles.

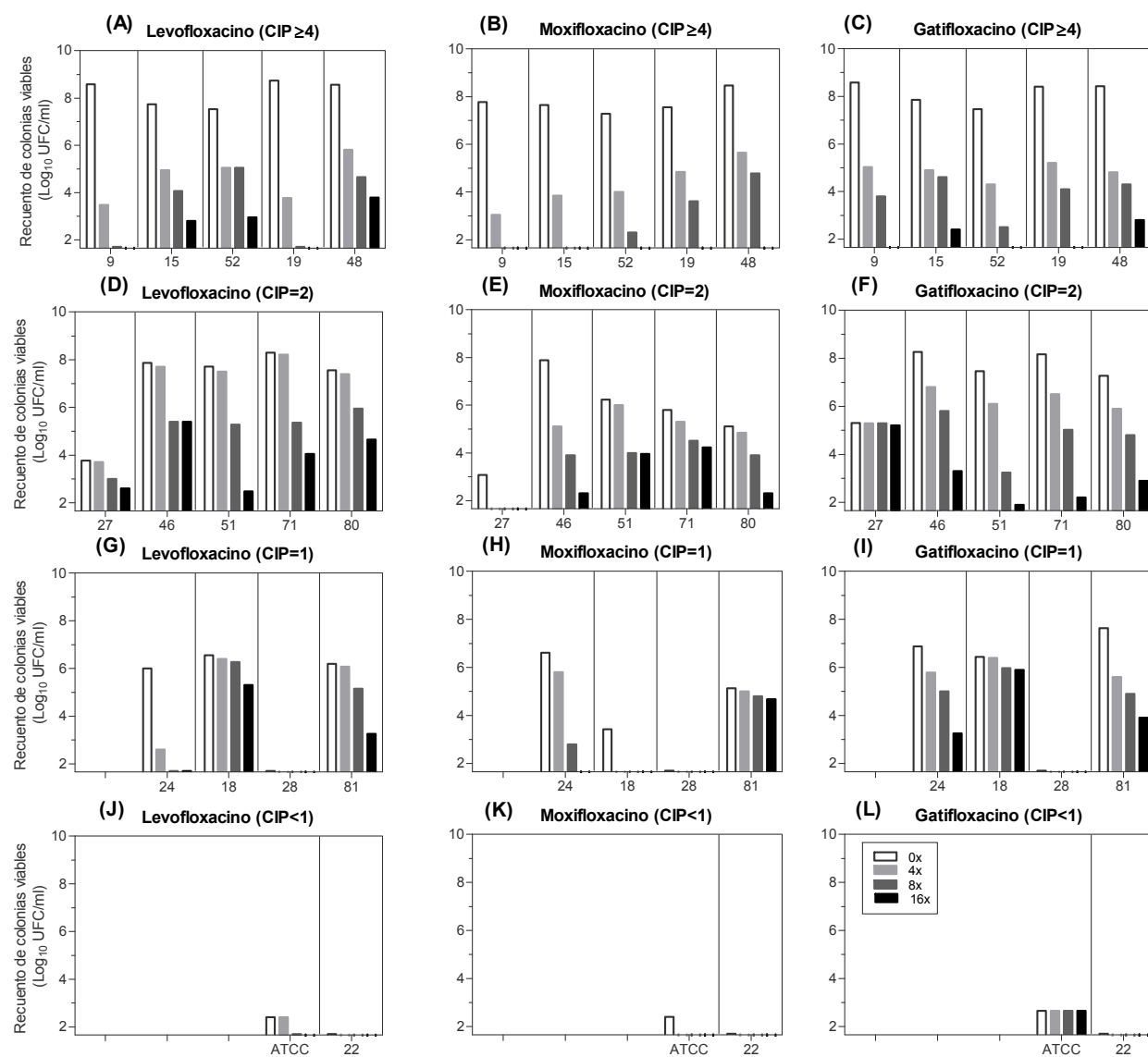
Las correlaciones establecidas a partir de los cocientes AUC/CMI calculados con la dilución en agar, independientemente del tiempo de lectura, fueron superiores (mayor  $r^2$  y menor CIA, criterio informativo de Akaike) a las correlaciones generadas con el método de la microdilución en caldo o el E-test. Del mismo modo se observaron diferencias sustanciales en el ajuste con los diferentes métodos en función del tiempo de incubación de la prueba de sensibilidad. Tomando la dilución en agar y una incubación de la prueba de sensibilidad de 48 horas como método de referencia, mayor  $r^2$  y menor CIA, el análisis de probabilidades indicó que este método es probablemente de entre 21-170 veces más correcto que la dilución en agar con una incubación estándar de 24 horas y de entre 1.000 y 100.000 veces más correcto que los métodos de microdilución o E-test, independientemente del tiempo de incubación de la prueba de sensibilidad.

#### **4.4 Estudio de la población de *S. maltophilia* tras la exposición a dosis únicas de fluorquinolonas**

La inoculación en el medio suplementado con quinolona, de las bacterias que se recuperaron del sistema *in vitro* tras la exposición, indicó que una sola dosis de levofloxacino, moxifloxacino o gatifloxacino enriqueció a las poblaciones de *S. maltophilia* de subpoblaciones resistentes. Como se detalla en la figura 26, para la mayoría de las cepas clínicas, la siembra en las placas con quinolona mostró abundantes colonias creciendo en las placas suplementadas con 4xCMI. En muchos casos se desarrollaron colonias resistentes también en las placas suplementadas con 8xCMI e incluso con 16xCMI.

No hubo selección de colonias resistentes con ninguna fluorquinolona en Sma22 y Sma28. La exposición a moxifloxacino tampoco seleccionó colonias resistentes a 4xCMI en las cepas clínicas Sma27, Sma18 y SmaATCC (figura 26-E,H,K) pero sí la de levofloxacino y gatifloxacino. Con la exposición a levofloxacino y gatifloxacino fue muy habitual encontrar colonias resistentes creciendo en las placas con 16xCMI. Esto ocurrió en 10 cepas expuestas a levofloxacino y en 11 cepas expuestas a gatifloxacino. Con moxifloxacino se seleccionaron colonias resistentes solo a 4xCMI en dos cepas clínicas (Sma9 y Sma15), hasta 8xCMI en cuatro cepas clínicas (Sma52, Sma19, Sma52 y Sma24) y hasta 16xCMI en cinco cepas clínicas (Sma46, Sma51, Sma71, Sma80 y Sma81).

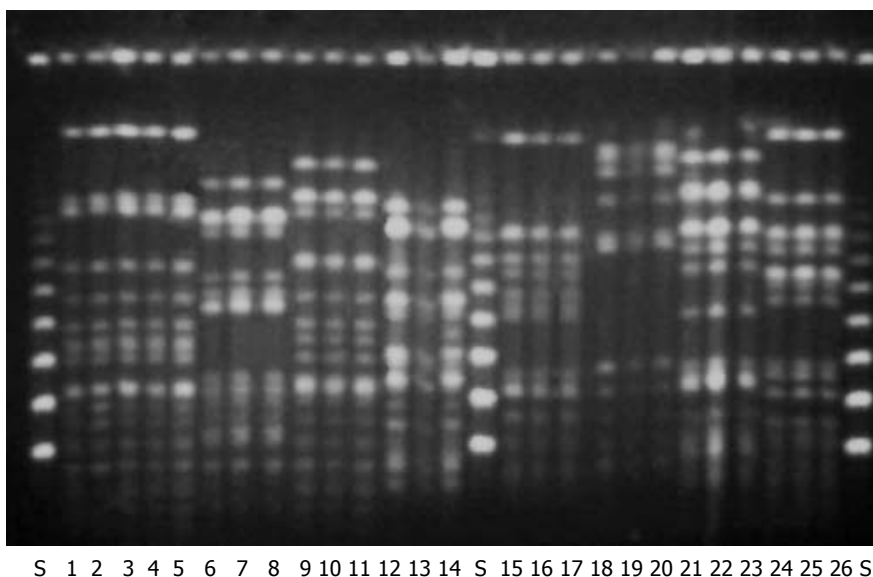
La frecuencia de aparición de colonias resistentes a 4x, 8x y 16xCMI fue también más baja con la exposición a moxifloxacino y más elevada con la exposición a gatifloxacino.



**Figura 26 .** Recuento de colonias resistentes en placas libres y suplementadas con levofloxacin, moxifloxacin o gatifloxacin

#### 4.4.1 Perfil de sensibilidad de los organismos seleccionados tras la exposición

Las colonias aisladas desde las placas de selección mantuvieron su resistencia tras repetidos pases en medios de cultivo libres de antimicrobiano confirmando que fueron mutantes estables y no células con una resistencia transitoria. El patrón de restricción con *Xba*I demostró que los mutantes resistentes fueron genéticamente indistinguibles de las cepas progenitoras (figura 27). Como se muestra en las tablas 31 y 32 los mutantes resistentes exhibieron un perfil de sensibilidad marcadamente diferente al de las cepas progenitoras (las tablas solo incluyen una selección de los aislados clínicos empleados en el sistema de microfiltración). La mayoría de los mutantes mostraron un aumento sustancial en la resistencia a quinolonas pero también a otros antimicrobianos no relacionados estructuralmente, como tetraciclinas o cloranfenicol.



**Figura 27.** Perfiles de PFGE de los mutantes resistentes derivados de las cepas clínicas Sma80, Sma46, Sma71, Sma19, Sm51, Sm15, Sma9 y Sma52.

M, mutante seleccionado tras la exposición a moxifloxacino, L, tras la exposición a levofloxacino 1-5; Sma80, Sma80M1, Sma80M2, Sma80L1, Sma80L2, 6-8; Sma46, Sma46M, Sma46L, 9-11; Sma71, Sma71M, Sma71L, 12-14; Sma19, Sma19M, Sma19L, 15-17; Sma51, Sma51M, Sma51L, 18-20; Sma15, Sma15M, Sma15L, 21-23; Sma9, Sma9M, Sma9L, 24-26; Sma52, Sma52M, Sma52L, S; marcadores de peso molecular.

La mayoría también aumentó la CMI a eritromicina y cotrimoxazol y mientras que un grupo claro de mutantes mostró un incremento en la resistencia a aminoglucósidos (mutantes derivados de Sma19 o Sma71 o el mutante Sma46L), otro o no presentó cambios (mutantes de Sma80 o Sma9) o incluso mostró una sensibilidad mayor que la cepa clínica progenitora (mutantes de Sma51 o Sma52) (tabla 32). Algunos mutantes exhibieron también aumentos en la CMI a los betalactámicos (mutantes derivados de Sma52, tabla 32).

El aumento de la resistencia en los mutantes dependió de la cepa progenitora, por ejemplo, los mutantes de Sma9 no aumentaron la CMI al ácido nalidíxico y la aumentaron en 8 veces a moxifloxacino mientras que los mutantes de Sma71 lo hicieron en 16 y 32-64 veces respectivamente, pero no del agente selector (levofloxacino o moxifloxacino) o de las concentraciones de quinolona empleadas para su aislamiento en placa (mutantes de Sma80).

**Tabla 31.** Sensibilidad a múltiples antimicrobianos y mecanismos de resistencia a quinolonas presentes en las cepas clínicas progenitoras

Cepa <sup>a</sup>	Expresión de genes			Cambios en QRDR <sup>c</sup>		CMI <sup>b</sup> (µg/ml)													
	<i>smeABC</i>	<i>smeD</i>	<i>smeF</i>	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	NAL	CIP	LEV	MOX	TET	DOX	CHO	GEN	AMK	ERI	CEF	CP	CP/C	T/S
Sma22	-	-	-	....	....	2	0,25	0,12	0,03	2	0,25	8	2	8	32	4	16	2	2
Sma18	-	+	-	....	....	8	1	0,5	0,12	16	4	16	64	256	128	256	32	32	2
Sma46	-	+	-	....	....	16	2	1	0,25	16	1	16	32	64	64	4	16	4	1
Sma80	-	+	-	....	....	8	2	1	0,5	32	4	16	64	64	256	256	32	16	0,25
Sma71	+	+	+	....	....	8	2	1	0,25	32	4	16	128	128	128	128	64	8	1
Sma51	-	+	-	....	....	16	2	1	0,25	16	2	16	16	128	128	4	32	16	4
Sma19	-	+	+	....	....	32	4	4	1	32	4	32	1024	512	128	64	64	16	32
Sma52	-	+	-	....	....	16	8	2	2	32	2	32	128	128	128	ND	16	8	2
Sma15	-	+	-	....	....	32	8	4	2	32	4	16	4096	1024	128	128	128	16	128
Sma9	+	+	+	....	Asp111→His	64	8	4	2	32	4	32	512	128	512	256	256	32	64

<sup>a</sup>Sma22 y Sma18 son cepas clínicas control. Sma46, Sma80, Sma71, Sma51, Sma52, Sma15 y Sma9 son las cepas progenitoras de los mutantes resistentes. <sup>b</sup>CMI<sub>48h</sub> <sup>c</sup>*gyrA*; Leu55.--.Gln155. *parC* Ile34.--.Arg124, según secuencia de Sma ATCC13367

NAL; ácido nalidíxico. CIP; ciprofloxacino. LEV; levofloxacino. MOX; moxifloxacino. TET; tetraciclina. DOX; doxiciclina. CHO; cloranfenicol. GEN; gentamicina. AMK; amikacina. ERI; eritromicina. CP; cefepima. CP/C; cefepima/ác. clav 2 µg/ml. CEF; ceftazidima. T/S; cotrimoxazol



**Tabla 32.** Sensibilidad a múltiples antimicrobianos y mecanismos de resistencia a quinolonas presentes en los mutantes resistentes derivados de las cepas clínicas progenitoras

Cepa <sup>a</sup>	Expresión de genes			Cambios en QRDR <sup>c</sup>		CMI <sup>b</sup> (µg/ml)													
	<i>smeABC</i>	<i>smeD</i>	<i>smeF</i>	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	NAL	CIP	LEV	MOX	TET	DOX	CHO	GEN	AMK	ERI	CEF	CP	CP/C	T/S
Sma46M	+	+		....	....	128	64	32	16	32	1	32	32	64	64	16	64	16	1
Sma46L	+	+	+	....	....	64	64	32	16	128	ND	64	128	128	512	16	64	16	4
Sma80M1	+	+	+	....	....	128	64	32	16	128	16	64	64	64	1024	256	64	32	1
Sma80M2	+	+	+	....	....	64	64	32	8	128	8	64	64	64	1024	256	128	32	1
Sma80L1	+	+	+	....	....	64	64	32	8	128	8	64	64	64	1024	256	64	32	1
Sma80L2	+	+	+	....	....	128	64	16	8	128	16	64	64	64	1024	256	128	32	1
Sma71M	+	+	+	....	....	128	64	16	8	128	8	64	512	512	1024	256	64	32	4
Sma71L	+	+	+	....	....	128	128	32	16	128	16	64	1024	1024	1024	256	64	16	4
Sma51M		+		....	....	128	32	16	8	64	8	64	8	64	512	4	32	16	64
Sma51L		+		....	....	128	32	32	16	128	8	64	8	64	512	4	32	16	128
Sma19M	+	+	+	....	....	64	32	16	4	64	8	64	4096	1024	512	64	64	16	32
Sma19L	+	+	+	....	....	64	64	32	16	128	16	128	4096	1024	512	64	64	16	32
Sma52M		+		....	....	128	64	32	32	128	8	64	64	64	512	ND	16	8	8
Sma52L		+	+	....	....	128	128	64	32	32	2	64	64	64	512	ND	16	16	16
Sma15M		+	+	....	....	128	128	64	32	128	16	64	4096	2048	1024	128	64	16	>128
Sma15L	+	+	+	....	....	512	128	64	32	64	8	256	4096	2048	512	>256	128	16	>128
Sma9M	+	+	+	....	Asp111→His	64	128	32	32	64	8	64	512	128	1024	256	128	16	64
Sma9L	+	+	+	....	Asp111→His	64	64	32	16	128	8	128	512	128	512	256	128	32	64

<sup>a</sup>mutantes resistentes derivados de las cepas clínicas Sma46, Sma80, Sma71, Sma51, Sma52, Sma15 y Sma9. <sup>b</sup>CMI<sub>48h</sub> <sup>c</sup>*gyrA*; Leu55.--.Gln155. *parC* Ile34.--.Arg124, según secuencia de Sma ATCC13367

NAL; ácido nalidíxico. CIP; ciprofloxacino. LEV; levofloxacino. MOX; moxifloxacino. TET; tetraciclina. DOX; doxiciclina. CHO; cloranfenicol. GEN; gentamicina. AMK; amikacina. ERI; eritromicina. CP; cefepima. CP/C; cefepima/ác. clav 2 µg/ml. CEF; ceftazidima. T/S; cotrimoxazol

#### **4.4.2 Caracterización de los mecanismos que confieren resistencia a quinolonas en las cepas mutantes obtenidas tras la exposición a levofloxacin y moxifloxacin**

Las cepas clínicas y mutantes derivados resistentes caracterizados molecularmente se recogieron en las tablas 31 y 32. Las cepas Sma22 y Sma18 fueron empleadas como cepas control. Como se mostró más arriba, dosis únicas de fluorquinolona no seleccionaron mutantes resistentes para Sma22. Dosis únicas de moxifloxacin pero si de levofloxacin seleccionaron mutantes resistentes para Sma18

#### **4.4.3 Sustituciones de aminoácidos en el QRDR de GyrA y ParC de los mutantes resistentes de *S. maltophilia***

Las sustituciones de aminoácidos encontradas en los QRDR de GyrA y ParC de las cepas clínicas y mutantes resistentes se encuentran resumidas en las tablas 31 y 32.

Ninguna de las cepas examinadas, cepas clínicas o mutantes, presentó sustituciones aminoacídicas en el QRDR de GyrA cuando las secuencias se compararon con la secuencia del fragmento correspondiente de la cepa ATCC13637.

Los mutantes Sma9M y Sma9L (derivados de Sma9) portaron una mutación puntual en *parC* que originó un cambio aminoacídico en la posición 111, Asp por His. Este cambio también se encontró en la secuencia de Sma9 por lo que la pérdida de sensibilidad a quinolonas en los mutantes no guardó relación alguna con la mutación detectada. La contribución de esta mutación en la resistencia a quinolonas en los aislados clínicos tampoco estuvo clara, ya que al menos dos aislados clínicos presentaron una sensibilidad similar a Sma9 sin cambios aparentes en sus secuencias de *parC* (tabla 31).

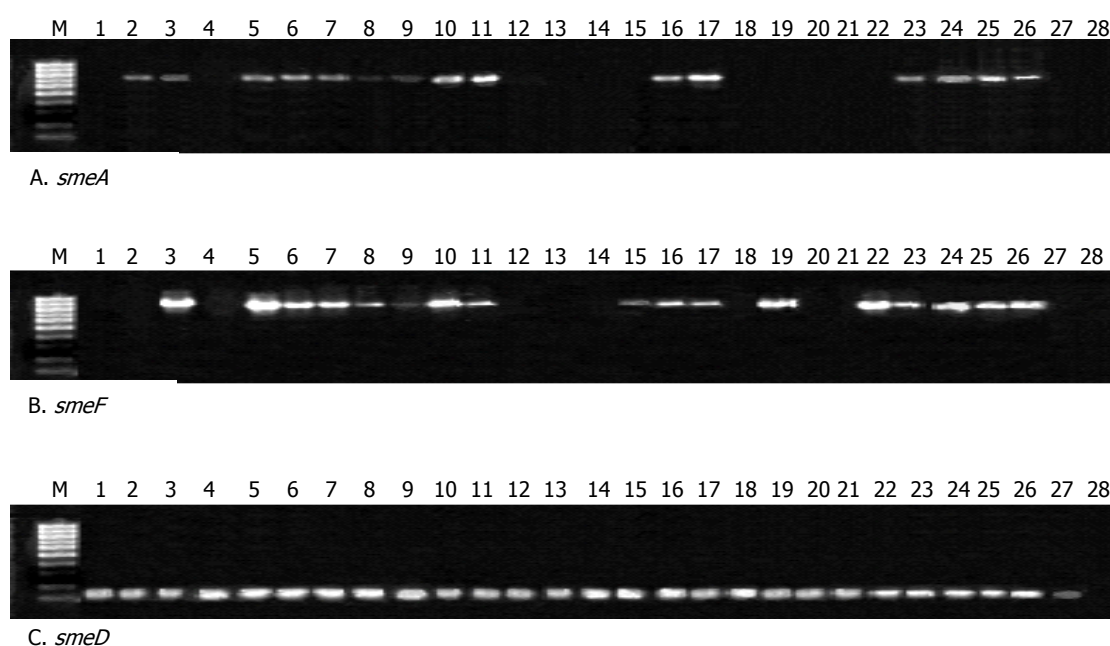
#### **4.4.4 Expresión de las bombas de expulsión *SmeABC* y *SmeDEF* en los mutantes resistentes de *S. maltophilia***

La contribución de *SmeABC* y *SmeDEF* en la resistencia adquirida se valoró mediante RT-PCR a través de la expresión de los genes *smeA* (*smeABC*) y *smeD* y *smeF* (*smeDEF*) en las cepas mutantes y sus respectivas cepas progenitoras. Como se aprecia en la figura 28A, el gen *smeA* se expresó en la cepa clínica Sma9 y más débilmente en la cepa Sma71 pero no en el resto de cepas progenitoras o en las cepas control Sma18 y Sma22. Los mutantes resistentes derivados de Sma9 y Sma71 sobreexpresaron *smeA*, en comparación con la expresión del gen en las cepas clínicas progenitoras. El gen también se expresó en los mutantes de las cepas clínicas Sma46, Sma80 y Sma19 y en el mutante Sma15L pero no en los mutantes de Sma51 y Sma52 y en el mutante Sma15M.

A diferencia de *smeABC*, *smeDEF* (figura 28B) se expresó en todas las cepas progenitoras, débilmente en la cepa control Sma18, pero no en Sma22. Como se aprecia en la figura, la señal del gen *smeD* fue sustancialmente más marcada que la señal de *smeF* (figura 28C), la cual solo apareció de forma nítida en las cepas clínicas Sma71, Sma19 y Sma9. La señal de *smeF*

detectada en los mutantes de Sma9 fue muy similar a la observada en la cepa progenitora y muy marcada en comparación para los mutantes derivados de Sma71 y Sma19 que sobreexpresaron el gen. Los mutantes derivados de Sma15 y los mutantes Sma46L y Sma52M (sin señal de *smeF* en la cepas progenitoras) sobreexpresaron con claridad *smeDEF*. La sobreexpresión de *smeDEF* se evidenció en el nivel de expresión del gen *smeF* (figura 28B) ya que la señal del gen *smeD* a las concentraciones de ARN patrón utilizadas (0,02 µg) no sufrió variaciones. Los mutantes Sma51M, Sma51L y el mutante de Sma52, Sma52L no expresaron *smeF*.

La sobreexpresión de *smeABC* o *smeDEF* ocurrió independientemente del nivel de expresión de estos genes en las cepas progenitoras, por ejemplo los mutantes derivados de las cepas Sma15 o Sma80 que no expresaron *smeABC* o *smeF* y los mutantes derivados de Sma9 o Sma71 que expresaron *smeABC* y *smeF* (figura 28) sobreexpresaron ambos sistemas, lo que sugiere que el nivel basal de expresión de estos sistemas no advierte de la probabilidad de que se sobreexpresen en presencia de una determinada presión selectiva. Interesantemente cuando la señal de *smeD* fue inexistente o muy débil (Sma22 y Sma18) no hubo selección de mutantes durante la exposición a moxifloxacino, por lo que el nivel de expresión de este gen podría ser un determinante de la selección de mutantes durante la exposición a quinolonas.



**Figura 28.** Expresión de *smeABC* (A) y *smeDEF* (B y C) mediante RT-PCR en los mutantes resistentes derivados de las cepas clínicas Sma46, Sma80, Sma71, Sma51, Sma19, Sma52, Sma15 y Sma9.

M; marcador de peso molecular de ADN (marcador de 100bp). 1-3; Sma46, Sma46M, Sma46L. 4-8; Sma80, Sma80M1, Sma80M2, Sma80L1, Sma80L2. 9-11; Sma71, Sma71M, Sma71L. 12-14; Sma51, Sma51M, Sma51L. 15-17; Sma19, Sma19M, Sma19L. 18-20; Sma52, Sma52M, Sma52L. 21-23; Sma15, Sma15M, Sma15L. 24-26; Sma9, Sma9M, Sma9L. 27; Sma18. 28; Sma22. Los pesos moleculares estimados correspondientes a los productos de PCR (RT-PCR) amplificados fueron de 742bp (A), 917bp (B) y 140bp (C).

#### 4.4.5 Contribución de los sistemas de expulsión *SmeABC* y *SmeDEF* en la resistencia adquirida a múltiples antimicrobianos

Como se aprecia en las tablas 31 y 32, la expresión o sobreexpresión de *smeABC*, *smeDEF* o de los genes de ambos sistemas explicó el fenotipo de multirresistencia presente en muchos de los mutantes analizados pero no en todos. En la mayoría de los mutantes se sobreexpresaron simultáneamente *smeABC* y *smeDEF* (n=13, 72% de las cepas). Un mutante sobreexpresó solo *smeABC* (5%), otro sobreexpresó solo *smeDEF* (5%) y tres (17%) no expresaron ni *smeABC* ni *smeDEF*. Estos últimos presentaron, con ligeras diferencias, un fenotipo de resistencia parecido al descrito en el resto de mutantes.

La contribución de las bombas de expulsión *SmeABC* y *SmeDEF* en la resistencia adquirida a múltiples antimicrobianos se resume en la tabla 33. Como se observa en esta tabla, la sobreexpresión de *smeABC* (*smeABC* + *smeDEF* -) se asoció con un aumento en la CMI a fluorquinolonas, aminoglucósidos y betalactámicos y un incremento leve en la CMI a tetraciclinas o cloranfenicol sin cambios en la CMI a eritromicina o cotrimoxazol (Tabla 32, sma46M). La sobreexpresión de *smeDEF* (*smeABC* - *smeDEF* +) aumentó varias veces la CMI a fluorquinolonas, eritromicina y cotrimoxazol, más moderadamente a tetraciclinas y cloranfenicol pero disminuyó la resistencia a los aminoglucósidos (Tabla 32, Sma52M). La sobreexpresión conjunta de ambos sistemas (*smeABC* + *smeDEF* +) aumentó en varias diluciones la CMI a fluorquinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol y eritromicina y en paralelo en algunos mutantes también a aminoglucósidos, betalactámicos y cotrimoxazol (Tabla 32, Sma46L, Sma71M y Sma71L), o a betalactámicos y cotrimoxazol (Tabla 32, derivados de Sma80), o a los aminoglucósidos (Tabla 32, derivados de Sma19), reflejo probablemente de las diferencias en el nivel relativo de expresión de ambos sistemas en diferentes mutantes.

Interesantemente el efecto de la sobreexpresión simultánea de *smeABC* y *smeDEF* en la resistencia a fluorquinolonas o cloranfenicol, sustratos compartidos por ambos sistemas de expulsión fue similar en los distintos mutantes pese a que derivaron de cepas clínicas diferentes con expresiones basales también diferentes (Tabla 31), y muy similar al efecto de la sobreexpresión aislada de *smeABC* o de *smeDEF*, es decir no hubo efecto sumatorio. Esta homogeneidad en el fenotipo de resistencia a fluorquinolonas y cloranfenicol sugiere que la sobreexpresión de estos sistemas debe estar conjuntamente regulada a un nivel superior.

El fenotipo de múltiple resistencia que exhibieron los mutantes Sma51L, Sma51M y Sma52L es compatible con la sobreexpresión de un sistema de expulsión probablemente homólogo a *smeDEF*, por la similitud de efectos en los diferentes grupos de antimicrobianos. Al igual que los mutantes que sobreexpresaron *smeDEF*, estos mutantes presentaron incrementos sustanciales en la CMI a fluorquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol y eritromicina y especialmente cotrimoxazol sin apenas cambios en la CMI a aminoglucósidos y betalactámicos.

**Tabla 33.** Contribución de los sistemas SmeABC y SmeDEF en la resistencia adquirida a múltiples antimicrobianos en los mutantes resistentes derivados de las cepas clínicas progenitoras tras su exposición a dosis terapéuticas de fluorquinolonas.

Sobreexpresión de:		CMI <sub>50</sub> (cambio medio, nº veces, de la CMI)														
<i>smeABC</i>	<i>smeDEF</i>	N (%)	NAL	CIP	LEV	MOX	TET	DOX	CHO	GEN	AMK	ERI	CEF	CP	CP/C	T/S
+	-	1	8	32	32	64	2	1	2	4	2	1	4	4	4	1
		(5,5)	(8,0)	(32,0)	(32,0)	(64,0)	(2,0)	(1,0)	(4,0)	(4,0)	(2,0)	(1,0)	(4,0)	(1,0)	(2,0)	(1,0)
-	+	1	128	64	32	32	128	8	64	64	64	512	ND	16	8	8
		(5,5)	(8,0)	(8,0)	(16,0)	(16,0)	(4,0)	(4,0)	(2,0)	(0,5)	(0,5)	(4,0)	(ND)	(1,0)	(1,0)	(4,0)
+	+	13	128	64	32	16	128	8	64	512	128	1024	256	64	32	4
		(72)	(8,6)	(25,8)	(19,4)	(24,3)	(3,8)	(2,8)	(4,6)	(2,5)	(2,2)	(4,8)	(1,4)	(1,7)	(1,8)	(2,8)
-	-	3	128	32	32	16	64	8	64	8	64	512	4	32	16	64
		(16,6)	(8,0)	(16,0)	(26,7)	(37,3)	(4,3)	(3,0)	(3,3)	(0,5)	(0,5)	(4,0)	(1,0)	(1,0)	(1,3)	(18,7)

#### **4.4.6 Relación entre la CMI, AUC/CMI y la selección de mutantes resistentes con dosis únicas de fluorquinolonas**

Como se aprecia en la figura 26 aparentemente no existió ninguna relación entre la selección de resistencias y la CMI de la cepa clínica a quinolonas. La exposición a levofloxacin, o gatifloxacin favoreció la selección de mutantes independientemente de la CMI a ciprofloxacino y la exposición a moxifloxacin la favoreció en cepas con una CMI  $\geq 1$   $\mu\text{g/ml}$ .

Sin embargo, la frecuencia e intensidad con la que aparecieron los mutantes resistentes sí estuvo estrechamente relacionada con la CMI del microorganismo y con el efecto antibacteriano desarrollado en las poblaciones expuestas. La frecuencia de aparición de los mutantes resistentes y la intensidad de la resistencia fue curiosamente mucho más elevada en las cepas de sensibilidad intermedia a ciprofloxacino (figura 26, ver CMI =1-2  $\mu\text{g/ml}$ ) que en las cepas más resistentes a ciprofloxacino (figura 26 ver CMI  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$ ) donde el efecto antibacteriano ejercido en la población general fue notablemente más reducido (0xCMI). En las cepas más sensibles (figura 26, ver CMI <1  $\mu\text{g/ml}$ ) la selección de mutantes resistentes fue inapreciable o inexistente y el efecto antibacteriano muy pronunciado.

La relación entre la CMI al agente selector (levofloxacin, moxifloxacin y gatifloxacin) el AUC/CMI, el efecto antibacteriano y el efecto en la selección de resistencias se resumió en las tablas 34, 35 y 36. Como se detalla en estas tablas, la frecuencia e intensidad de aparición de mutantes aumentó paulatinamente con el incremento de la CMI o el decremento del AUC/CMI a fluorquinolonas hasta alcanzar las frecuencias pico. Desde máximos, con el aumento de la CMI o la disminución del AUC/CMI las frecuencias de selección disminuyeron hasta desaparecer. De esta forma, la frecuencia de selección de mutantes fue máxima cuando la dosis de gatifloxacin se expuso a cepas de CMI<sub>GAT</sub> =0,5  $\mu\text{g/ml}$  (tras la exposición, el 95% de la población recuperada para estas cepas creció a 4xCMI y un 54% a 16xCMI) , o cuando la dosis de levofloxacin se expuso a cepas de CMI<sub>LEV</sub> =0,5-1  $\mu\text{g/ml}$  (71-76% a 4xCMI y 0-7% a 16xCMI) o cuando la dosis de moxifloxacin se expuso a cepas de CMI<sub>MOX</sub> =0,25-0,5  $\mu\text{g/ml}$  expuestas a (35-55% a 4xCMI y 0-12% a 16xCMI). La selección de resistencias fue inexistente cuando la exposición a moxifloxacin o levofloxacin fue equivalente a un AUC/CMI >104 horas y de >179 horas respectivamente. Gatifloxacin seleccionó resistencias en todo el intervalo examinado.

**Tabla 34.** Relación entre la CMI y el AUC/CMI de levofloxacin y la selección de resistencias *in vitro*

CMI <sub>LEV</sub> *	nº cepas	AUC/CMI	Recuento colonias (log UFC/ml) a:				% población recuperado		
			0x	4x	8x	16x	4x	8x	16x
4	3	11,2	8,3±0,5	4,1±0,8	2,5±1,4	2,1±0,6	0,1	0,0	0,0
2	3	22,38	7,4±1,3	4,5±1,7	3,8±1,8	2,8±1,1	0,2	0,1	0,0
1	5	44,75	7,5±0,8	7,4±0,8	5,4±0,3	4,0±1,1	71,2	2,5	0,1
0,5	2	89,5	5,2±2,0	5,1±1,9	4,6±2,3	4,0±1,9	76,7	34,0	6,1
0,25	2	179	2,0±0,5	2,1±0,5	1,7±0,0	<	50,0	10,0	<
0,125	1	358	1,7	<			<		

\*CMI<sub>LEV</sub> a las 48h (µg/ml)**Tabla 35.** Relación entre la CMI y el AUC/CMI de moxifloxacin y la selección de resistencias *in vitro*

CMI <sub>MOX</sub> *	nº cepas	AUC/CMI	Recuento colonias (log UFC/ml) a:				% población recuperado		
			0x	4x	8x	16x	4x	8x	16x
2	4	12,9	7,6±0,2	3,6±0,5	1,9±0,3	<	0,02	0,00	<
1	3	25,9	8,0±0,5	5,2±0,4	4,1±0,6	1,9±0,3	0,17	0,01	0,00
0,5	3	51,8	5,9±1,0	5,3±0,7	3,3±0,8	2,0±0,4	35,30	3,11	0,08
0,25	4	103,6	5,7±0,6	5,4±0,5	4,4±0,4	4,3±0,4	54,73	17,60	12,82
0,125	2	207,2	2,7±0,9	<			<		
0,06	2	431,7	2,05	<			<		
0,03	1	863,3	1,70	<			<		

\*CMI<sub>MOX</sub> a las 48h (µg/ml)**Tabla 36.** Relación entre la CMI y el AUC/CMI de gatifloxacin y la selección de resistencias *in vitro*

CMI <sub>GAT</sub> *	nº cepas	AUC/CMI	Recuento colonias (log UFC/ml) a:				% población recuperado		
			0	4x	8x	16x	4x	8x	16x
8	1	3,8	8,6	5,0	3,8	<	0,0	0,0	<
4	3	7,6	7,9±0,5	4,8±0,5	3,7±1,1	1,9±0,4	0,1	0,0	0,0
2	1	15,2	8,4	4,8	4,3	2,8	0,0	0,0	0,0
1	6	30,3	7,6±0,5	6,1±0,5	4,8±0,8	2,9±0,7	3,9	0,4	0,0
0,5	2	60,7	5,9±0,8	5,8±0,8	5,6±0,5	5,6±0,5	94,6	66,2	53,6
0,125	3	242,7	2,0±0,5	2,0±0,5	2,0±0,5	2,0±0,5	33,3	33,3	33,3

\*CMI<sub>GAT</sub> a las 48h (µg/ml)

#### **4.5 Efecto de los inhibidores de amplio espectro de las bombas de expulsión en la resistencia de *S. maltophilia***

El efecto de reserpina (25 µg/ml) y Phe-Arg-β naftilamida (20 µg/ml), PAβN, en la CMI de ácido nalidíxico, levofloxacino, moxifloxacino, tetraciclina o cloranfenicol en las cepas clínicas y mutantes resistentes de *S. maltophilia*, se muestra en las tablas 37 y 38.

Como se muestra en las tablas, reserpina solo afectó y levemente la CMI de levofloxacino, moxifloxacino o cloranfenicol, sin prácticamente cambios en la CMI para ácido nalidíxico o tetraciclina. El efecto de PAβN en levofloxacino, moxifloxacino o tetraciclina no fue diferente, pero si en la CMI de ácido nalidíxico o cloranfenicol. PAβN redujo la CMI para ácido nalidíxico o cloranfenicol en al menos una dilución en el 87% y 37% de las cepas clínicas y en al menos dos, en el 41,5 y 12% de las cepas clínicas respectivamente. El porcentaje de cepas resistentes a ácido nalidíxico o cloranfenicol disminuyó significativamente ( $p < 0,01$ ) en presencia de PAβN.

Comparativamente el efecto de ambos inhibidores afectó a la CMI de más cepas mutantes que clínicas. Reserpina y PAβN redujeron una dilución la CMI de levofloxacino en el 38,8% de los mutantes, por el 39% y 24% de las cepas clínicas y la de moxifloxacino en el 55,5% de los mutantes, por el 22% y 28% de las cepas clínicas. De mismo modo PAβN redujo la CMI de cloranfenicol en una dilución en el 44% de los mutantes, frente al 38% de las cepas clínicas y la de ácido nalidíxico en el 100% de los mutantes frente al 86% de las cepas clínicas. La mayoría de mutantes en presencia de PAβN rebajaron la CMI de ácido nalidíxico en dos, tres o cuatro diluciones y aun así, en pocos casos se revirtió la CMI a los niveles de las cepas progenitoras.

Hay que destacar que muchas cepas clínicas presentaron una CMI mayor en presencia de reserpina y especialmente de PAβN, y que este efecto fue más pronunciado en el caso de tetraciclina.

##### **4.5.1 Efecto de los inhibidores de amplio espectro de las bombas de expulsión en los sistemas SmeABC y SmeDEF de *S. maltophilia***

Como muestran los resultados de sensibilidad recogidos en la tabla 37, reserpina o PAβN claramente no inhibieron los efectos de los sistemas de expulsión SmeABC y SmeDEF en la resistencia a quinolonas, tetraciclina y cloranfenicol de los mutantes obtenidos *in vitro*.

Ambos inhibidores exhibieron efectos leves en la CMI de las fluorquinolonas en mutantes que sobreexpresaron SmeABC, SmeDEF, SmeABC y SmeDEF y en mutantes que no sobreexpresaron ni SmeABC ni SmeDEF a diferencia de la combinación con el ácido nalidíxico. En combinación con PAβN la CMI de los mutantes a ácido nalidíxico se redujo en varias diluciones independientemente de la sobreexpresión o no de uno o ambos mecanismos.

La combinación con este inhibidor también redujo la CMI a ácido nalidíxico o fluorquinolonas en cepas que basalmente no sobreexpresaron SmeABC o SmeDEF lo que apoyaría que el efecto de ambos inhibidores debe ser sobre bombas de expulsión adicionales diferentes de las caracterizadas.



**Tabla 37.** Efecto de reserpina en la sensibilidad de PAβN en la resistencia a quinolonas, tetraciclina y cloranfenicol dad de aislados clínicos de *S. maltophilia* genéticamente diferentes ( $n=106$ )

	-reserpina -PAβN	+ reserpina							+ PAβN						
	CMI <sub>90</sub> (%R)	Nº cepas que cambian la CMI <sup>a</sup> (diluciones log <sub>2</sub> )					% cepas con CMI ≤1log <sub>2</sub>	CMI <sub>90</sub> (%R)	Nº cepas que cambian la CMI <sup>a</sup> (diluciones log <sub>2</sub> )					% cepas con CMI ≤1log <sub>2</sub>	CMI <sub>90</sub> (%R)
		≥1	0	-1	-2	≤-3			≥1	0	-1	-2	≤-3		
Ac. nalidíxico	128 (48,1)	33	64	6	1	1	7,5	128 (59,6)	14	48	25	19		86,8	16 (9,4)*
Levofloxacino	8 (10,4)	6	58	42			39,6	4 (8,5)	16	64	22	4		24,5	4 (9,5)
Moxifloxacino	4 (12,3)	16	66	23	1		22,6	4 (10,4)	21	54	23	7		28,3	2 (8,5)
Tetraciclina	32 (97,2)	12	89	4	1		4,7	32 (95,3)	38	63	4	0	1	4,7	64 (97,2)
Cloranfenicol	64 (54,7)	30	61	14	1		14,2	64 (58,5)	13	54	26	10	3	36,8	64 (44,3)*

\* $p<0.01$ . <sup>a</sup>CMI; 48h

**Tabla 38.** Efecto de reserpina y PAβN en la CMI 48h (nº cambios xCMI) de los mutantes resistentes y cepas progenitoras a quinolonas, tetraciclina y cloranfenicol

Cepa	Ac. Nalidíxico			Levofloxacinó			Moxifloxacinó			Tetraciclina			Cloranfenicol		
	-RES -PAβN	+RES <sup>a</sup>	+PAβN <sup>a</sup>	-RES -PAβN	+RES	+PAβN	-RES -PAβN	+RES	+PAβN	-RES -PAβN	+RES	+PAβN	-RES -PAβN	+RES	+PAβN
Sma22	2	2	2	0,12	0,12	0,12	0,03	0,03	0,03	2	2	2	8	8	8
Sma18	8	8	<b>4 (2)</b>	0,5	0,5	0,5	0,12	0,12	0,12	16	16	16	16	16	<b>4 (4)</b>
Sma46	16	16	<b>4 (4)</b>	1	<b>0.5 (2)</b>	<b>0.5 (2)</b>	0,25	0,25	0,25	16	16	16	16	16	<b>8 (2)</b>
Sma46M	128	128	<b>16 (8)</b>	32	<b>16 (2)</b>	<b>16 (2)</b>	16	<b>4 (4)</b>	<b>4 (4)</b>	16	16	16	32	32	<b>4 (8)</b>
Sma46L	64	64	<b>4 (16)</b>	32	<b>16 (2)</b>	<b>16 (2)</b>	16	<b>4 (4)</b>	<b>4 (4)</b>	128	128	128	64	64	64
Sma80	8	8	<b>4 (2)</b>	1	1	1	0,5	0,5	0,5	32	32	32	16	16	16
Sma80M1	128	64	<b>32 (4)</b>	32	<b>16 (2)</b>	<b>16 (2)</b>	16	<b>4 (4)</b>	<b>4 (4)</b>	128	128	128	64	64	<b>32 (2)</b>
Sma80M2	64	64	<b>16 (4)</b>	32	<b>16 (2)</b>	<b>16 (2)</b>	8	8	<b>4 (2)</b>	128	128	128	64	64	64
Sma80L1	64	64	<b>16 (4)</b>	32	32	32	8	8	8	128	128	128	64	64	64
Sma80L2	128	128	<b>32 (4)</b>	16	16	16	8	<b>4 (2)</b>	<b>4 (2)</b>	128	128	128	64	64	64
Sma71	8	8	<b>2 (4)</b>	1	1	1	0,25	0,25	0,25	32	32	32	16	16	<b>8 (2)</b>
Sma71M	128	128	<b>16 (8)</b>	16	16	16	8	8	8	128	128	128	64	64	32
Sma71L	128	128	<b>32 (4)</b>	32	32	32	16	16	16	128	128	128	64	64	32
Sma51	16	16	<b>8 (2)</b>	1	1	1	0,25	0,25	0,25	16	16	16	16	16	16
Sma51M	128	128	<b>8 (16)</b>	16	16	16	8	<b>4 (2)</b>	<b>4 (2)</b>	64	64	64	64	64	<b>32 (2)</b>
Sma51L	128	128	<b>32 (4)</b>	32	32	32	16	<b>4 (4)</b>	<b>8 (2)</b>	128	128	128	64	64	<b>32 (2)</b>
Sma19	32	32	<b>8 (4)</b>	4	4	4	1	1	1	32	32	32	32	32	<b>8 (4)</b>
Sma19M	64	64	<b>16 (4)</b>	16	16	16	4	4	4	64	64	64	64	64	64
Sma19L	64	64	<b>16 (4)</b>	32	32	32	16	<b>8 (2)</b>	16	128	128	128	128	128	<b>64 (2)</b>
Sma52	16	16	<b>8 (2)</b>	2	2	2	2	2	2	32	32	32	32	32	32
Sma52M	128	128	<b>32 (4)</b>	32	32	32	32	32	32	128	128	128	64	64	64
Sma52L	128	128	<b>64 (2)</b>	64	64	64	32	32	32	32	32	32	64	64	64
Sma15	32	32	<b>16 (2)</b>	4	4	4	2	<b>1 (2)</b>	2	32	32	32	16	16	<b>8 (2)</b>
Sma15M	128	128	<b>32 (4)</b>	64	64	<b>32 (2)</b>	32	<b>16 (2)</b>	32	128	128	128	64	64	64
Sma15L	512	512	<b>32 (16)</b>	64	<b>32 (2)</b>	<b>32 (2)</b>	32	32	<b>8 (4)</b>	64	64	64	256	<b>128 (2)</b>	<b>128 (2)</b>
Sma9	64	64	<b>8 (8)</b>	4	4	4	2	2	2	32	32	32	32	32	<b>8 (4)</b>
Sma9M	128	128	<b>16 (8)</b>	32	32	32	32	<b>16 (2)</b>	32	64	64	64	64	64	<b>32 (2)</b>
Sma9L	128	128	<b>16 (8)</b>	32	<b>16 (2)</b>	<b>16 (2)</b>	16	<b>8 (2)</b>	<b>8 (2)</b>	128	128	128	128	128	<b>32 (4)</b>

<sup>a</sup>RES ; reserpina, +PAβN<sup>a</sup>

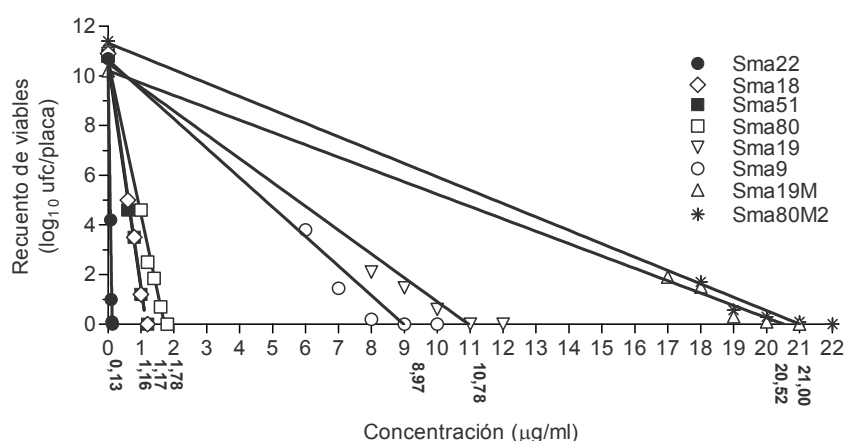
## 4.6 Optimización de dosis de moxifloxacin en el tratamiento de las infecciones por *S. maltophilia*

### 4.6.1 CMI y CPM

La CMI, CPM y los mecanismos de resistencia a quinolonas caracterizados en las cepas seleccionadas se muestran en la tabla 39. La CPM se estimó como el punto de intercepción de la línea de regresión del recuento de viables frente a la concentración, con el eje X, figura 29.

**Tabla 39.** Sensibilidad de los aislados empleados en la valoración farmacodinámica de los regímenes de moxifloxacin

S. maltophilia/ PFGE	CMI <sub>24h</sub> /CMI <sub>48h</sub>	Expresión de los genes			Cambios puntuales en QRDR		CPM
		<i>smeABC</i>	<i>smeD</i>	<i>smeF</i>	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	
Sma22/A	0,03/0,03	-	-	-	-	-	0,13
Sma18/B	0,125/0,125	-	+	-	-	-	1,17
Sma51/C	0,25/0,25	-	+	-	-	-	1,16
Sma80/D	0,25/0,5	-	+	-	-	-	1,78
Sma19/E	1/1	-	+	+	-	-	10,78
Sma9/F	2/2	+	+	+	-	Asp <sub>111</sub> -His	8,97
Sma19M/E	4/4	+	+	+	-	-	20,52
Sma80M2/D	8/8	+	+	+	-	-	21,00



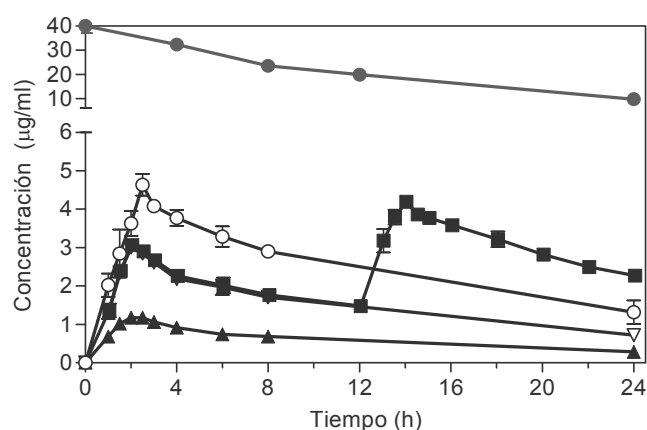
**Figura 29.** Representación gráfica del cálculo de la CPM

Como se muestra en la tabla, la CMI y especialmente la CPM estuvieron estrechamente relacionadas con el patrón de expresión, sobreexpresión, de los genes de los sistemas de expulsión *SmeABC* y *SmeDEF*. La ausencia de señal (Sma22) origina valores de CMI y CPM extremadamente bajos. La señal de *smeD* (Sma18, Sma51 y Sma80) se asoció con valores de CMI de entre 0,125-0,5 y de CPM de entre 1,1 y 1,8  $\mu\text{g/ml}$  y la detección de *smeF* incrementó la CMI hasta 1-2  $\mu\text{g/ml}$  y la CPM hasta valores de entre 9 y 11  $\mu\text{g/ml}$ . La sobreexpresión de *SmeABC* y *SmeF* en los mutantes aumento las CMI hasta 4-8  $\mu\text{g/ml}$  y la CPM hasta los 20-21  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 4.6.2 Farmacocinética e índices FC/FD

El bioensayo fue lineal ( $r^2 > 0,99$ ) entre los 0,125 y 8  $\mu\text{g/ml}$  con un límite cuantificable de 0,06  $\mu\text{g/ml}$ . La variabilidad intradía y entredías del ensayo (%CV), calculada a una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ , fue de 1,1 y 6,32%, 2,05 y 7,28%, 1,29 y 6,28% y de 1,42 y 3,28% para los regímenes simulados de moxifloxacin 200 mg, 400 mg, 800 mg y 400 mg/12h, respectivamente.

Las curvas concentración-tiempo determinadas a partir de las muestras procedentes del compartimento periférico del sistema *in vitro*, se representan en la figura 30. Las concentraciones calculadas en el compartimento central y de infección ambos variaron menos del 3% confirmando la rápida redistribución de las concentraciones en el sistema *in vitro*.



**Figura 30.** Perfil de las concentraciones simuladas (datos observados) de moxifloxacin dosis de 200 mg/24 h (▲), 400 mg/24 h (▼), 800 mg/24 h (○) y 400 mg/12 h (■) y del inhibidor de las bombas de expulsión Phe-Arg-naftilamida (●) en el sistema *in vitro*.

Los parámetros farmacocinéticos (media  $\pm$  desviación estándar), calculados a partir de los niveles de antimicrobiano detectados en el compartimento de infección, se resumen en la tabla 40. La correlación entre los datos experimentales y los pronosticados por el modelo no compartimental fue superior a 0,99. La  $C_{\max}$ , AUC,  $T_{\max}$  y  $t_{1/2}$  calculados para las diferentes dosis fueron muy similares a los valores diana. El porcentaje de error entre la  $C_{\max}$  experimental y diana para las dosis de 200 mg, 400 mg y 800 mg fue del 3,44%, 3,79% y 2,11% respectivamente. Para el inhibidor de las bombas de expulsión, PAßN, se calculó una  $C_{\max}$  de  $40 \pm 3,1$   $\mu\text{g/ml}$  y una  $C_{\min}$  de  $9,7 \pm 0,8$   $\mu\text{g/ml}$  (de acuerdo a la vida media utilizada 12,5 horas). De esta forma las concentraciones del inhibidor se situaron por encima de los 20  $\mu\text{g/ml}$  durante más del 50% del periodo de dosificación.

De acuerdo a la sensibilidad de las cepas a moxifloxacin tras una incubación de 48 horas, las dosis empleadas generaron un intervalo de exposiciones de moxifloxacin equivalentes a un  $\text{AUC}_{0-24}/\text{CMI}$  de 4,45 a 1186,3 h,  $C_{\max}/\text{CMI}$  de 0,38 a 100,33 y  $T_{>\text{CMI}}$  de 0 a 100% del intervalo de dosificación.

**Tabla 40.** Parámetros farmacocinéticos de moxifloxacino en el sistema in vitro

Parámetro	Dosis				
	200 mg (n=4)	400 mg (n=4)	800 mg (n=3)	400 mg q.12h (n=3)	
				0-12h	12-24h
C <sub>max</sub> (µg/ml)	1,2 ± 0,0	3,01 ± 0,1	4,63 ± 0,3	3,01 ± 0,1	4,14 ± 0,0
T <sub>max</sub> (h)	2,2 ± 0,3	2,00 ± 0,0	2,50 ± 0,0	2,00 ± 0,0	14,00 ± 0,0
C <sub>res</sub> (µg/ml)	0,3 ± 0,0	0,72 ± 0,0	1,31 ± 0,3	1,36 ± 0,1	2,22 ± 0,1
t <sub>1/2</sub> (h)	12,5 ± 0,3	12,40 ± 0,7	13,25 ± 2,1	11,82 ± 1,2	12,54 ± 0,0
AUC <sub>tot</sub> (h*µg/ml)	14,2 ± 0,4	35,59 ± 2,3	60,07 ± 6,5	22,28 ± 1,3	45,30 ± 1,4
AUC <sub>infobs</sub> (h*µg/ml)	19,4 ± 0,9	48,52 ± 3,2	85,88 ± 16,7	45,58 ± 3,0	85,47 ± 2,7
Cl <sub>tot</sub> /F (L)	10,3 ± 0,5	8,27 ± 0,5	9,53 ± 1,7	8,80 ± 0,6	4,68 ± 0,1
V/F (L)	185,9 ± 3,9	147,95 ± 12,0	178,95 ± 7,4	149,90 ± 13,9	84,70 ± 2,5
Coefficiente correlación	0,99 ± 0,0	0,99 ± 0,00	0,99 ± 0,0	0,99 ± 0,0	0,99 ± 0,0
Valores de referencia en humanos: 200 mg; C <sub>max</sub> 1,16±1,35 µg/ml, AUC 15,4±1,20 µg/ml·h, t <sub>1/2</sub> ; 12,7±1,90 h (294). 400 mg; C <sub>max</sub> 3,10±1,00 µg/ml, AUC 36,1±9,10 µg/ml·h, t <sub>1/2</sub> ; 14,0±1,14 h (296,302). 800 mg; C <sub>max</sub> 4,73±1,16 µg/ml, AUC 59,9±1,24 µg/ml·h, t <sub>1/2</sub> ; 12,3±1,13 h (294)					

#### 4.6.3 Efecto antimicrobiano

El efecto antibacteriano de moxifloxacino (r<sub>24h</sub>, r<sub>max</sub>, T<sub>99,9%</sub> y AUBK) se resume en la tabla 41. En ausencia de antimicrobiano todas las cepas mostraron una cinética de crecimiento similar con un incremento medio en el recuento de bacterias viables (log UFC/ml) a las 24 horas con respecto al inoculo inicial de 2,55 (2,3-3,1) unidades logarítmicas y un AUGC medio de 187,7 (178,5-201,2) UFC/ml·h. La administración de moxifloxacino incluso a dosis bajas y frente a las cepas con mayor CMI redujo el número de bacterias viables por debajo del inoculo inicial en todos los tiempos analizados, reduciendo el AUGC en un 99,7-99,9% y el inoculo inicial de 0,3-5,7 unidades logarítmicas después de 24 horas de exposición.

Por dosis, la de 200 mg ocasionó una rápida reducción de bacterias viables en Sma22 (CMI 0,03 µg/ml) y Sma18 (CMI 0,125 µg/ml) con descensos máximos (5,6-5,9 unidades log) aproximadamente 6 horas después de iniciar la administración. Este efecto fue seguido de leves recrecimientos bacterianos que se prolongaron hasta las 24 horas. A este tiempo se observaron reducciones de entre 4-5,1-unidades log y AUBKC mínimos, del orden de 13-32 log UFC/ml·h. Este patrón de actividad-recrecimiento bacteriano se observó más claramente en los aislados Sma51 (CMI 0,25 µg/ml), Sma80 (CMI<sub>48h</sub> 0,5 µg/ml) o Sma19 (CMI 1 µg/ml).

Las medidas T<sub>99,9%</sub>, r<sub>max</sub>, r<sub>24h</sub> o AUBKC aumentaron de manera gradual (a mayor r<sub>max</sub> o r<sub>24h</sub>, menor reducción del número de viables) conforme aumentó la CMI del microorganismo. Con la dosis de 400 mg se consiguió la erradicación de Sma22, y reducciones del recuento de viables sobre el resto de aislados superiores a los obtenidos con la dosis de 200 mg (r<sub>24h</sub> y AUBKC más bajos).

**Tabla 41.** Efecto antimicrobiano de diferentes regímenes de moxifloxacino frente a *S. maltophilia* con diferentes grados de sensibilidad.

Cepa (CMI <sup>a</sup> , µg/ml)	Dosis (mg)/ ITD <sup>b</sup> (h)	AUC/CMI	C <sub>max</sub> /CMI	T <sub>&gt;CMI</sub>	n	Recuento de viables (log UFC/ml)		AUBKC (log UFC/ml×h)	T <sub>99,9</sub> (h)
						r24h	rmax		
Sma22 (0,03)	200/24	474	40,0	100	4	-5,1 ± 0,9	-5,6 ± 0,3	13,5 ± 4,6	2,0
	400/24	1186,3	100,3	100	4	-5,5 ± 0,9	-5,5 ± 0,9	8,9 ± 0,3*	2,5 ± 1,0
Sma18 (0,12)	200/24	113,8	9,6	99,2	4	-4,0 ± 0,2	-5,9 ± 0,1	32,0 ± 7,3	2,5 ± 1,0
	400/24	284,7	24,1	99,6	4	-4,7 ± 0,5	-5,8 ± 0,1	24,2 ± 9,6	3,0 ± 1,1
	800/24	480,6	37,0	99,75	3	-5,7 ± 0,1*	-5,6 ± 0,1	18 ± 6,8*	3,0 ± 1,4
Sma 51 (0,25)	200/24	56,9	4,8	98,4	3	-2,0 ± 0,7	-5,2 ± 0,4	39,6 ± 8,3	2,0
	400/24	142,4	12,0	99,2	3	-5,0 ± 0,7*	-5,5 ± 0,2	23,7 ± 10,5	3,3 ± 1,1
	800/24	240,3	18,5	99,5	3	-5,6 ± 0,8**	-5,6 ± 0,8	12,9 ± 4,1**	2,0
Sma80 (0,5)	200/24	28,4	2,4	61,1	3	-0,7 ± 0,5	-5,1 ± 0,3	61,7 ± 1,4	5,3 ± 1,1
	400/24	71,2	6,0	98,1	5	-3,6 ± 0,8*	-5,5 ± 0,3	30,9 ± 8,5*	3,6 ± 1,7
	400/12	135,2	4,1	100	4	-5,7 ± 0,5**	-5,8 ± 0,5	16,5 ± 3,3**	2,0
	800/24	120,1	4,6	98,9	5	-5,7 ± 0,4**	-5,7 ± 0,4	13,3 ± 3,8**	2,8 ± 1,1
Sma19 (1)	200/24	14,2	1,2	1,9	4	-0,3 ± 0,8	-2,9 ± 0,4	88,0 ± 2,8	>24
	400/24	35,6	3,0	78	5	-0,6 ± 0,5	-4,4 ± 0,7	64,3 ± 10,4	4,8 ± 1,8
	400/12	67,6	4,1	96,8	4	-3,1 ± 1,2**	-4,6 ± 1,2	45,4 ± 21,8**	4,0
	800/24	60,1	4,6	97,9	4	-2,7 ± 0,6**	-5,3 ± 0,6	47,2 ± 4,4**	4,5 ± 1,0
Sma9 (2)	400/24	17,8	1,5	19,45	5	-1,2 ± 0,9	-3,4 ± 0,3	80,8 ± 13,7	5,6 ± 1,5
	400/12	33,8	2,1	68,1	3	-4,3 ± 1,0*	-4,6 ± 1,2	58,6 ± 17,0	6,0 ± 2,8
	800/24	30,0	2,3	67,2	6	-3,3 ± 0,3*	-4,7 ± 0,5	52,1 ± 12,9	5,6 ± 1,5
Sma19M (4)	400/24	8,9	0,7	0,0	3	-0,5 ± 0,5	-2,1 ± 0,1	108,0 ± 13,1	>24
	400/12	16,9	1,0	3,33	4	-1,7 ± 0,6*	-2,6 ± 0,7	95,1 ± 6,4	>24
	800/24	15,0	1,2	3,41	3	-0,8 ± 0,2	-3,0 ± 0,2	90,2 ± 6,4	9,0 ± 1,4
Sma80M2 (8)	400/24	4,4	0,4	0,0	4	-0,3 ± 0,4	-2,8 ± 1,1	118,2 ± 5,3	>24
	400/12	8,4	0,5	0,0	3	-2,4 ± 0,7**	-2,3 ± 0,6	96,8 ± 8,8	>24
	800/24	7,5	0,6	0,0	3	-0,7 ± 0,1	-3,0 ± 0,1	108,8 ± 0,5	>24

<sup>a</sup>CMI a las 48h, ITD<sup>b</sup>; intervalo de dosis. Ajuste de Bonferroni para las comparaciones múltiples obtenidas con el modelo lineal de efectos mixtos: \* $p < 0,05$  vs dosis de 200 mg, + $p < 0,05$  vs. dosis de 400 mg, # $p < 0,05$  vs. dosis de 800 mg

En Sma51 y Sma80 se observaron leves recrecimientos bacterianos ( $r_{\max}$  y  $r_{24h}$  de -5,5 y -5,0 y -5,5 y 3,6 log UFC/ml respectivamente), que fueron muy acusados en los aislados de CMI  $\geq 1$   $\mu\text{g/ml}$ . Con la dosis de 800 mg fueron los aislados Sma18 y Sma51 fueron erradicados. Idénticos resultados se obtuvieron con esta dosis y la dosis de 400 mg/12h frente a Sma80. Ambas dosis, 800 mg y 400 mg/12h, originaron una mayor reducción máxima de viables, menor  $T_{99,9\%}$ ,  $r_{24h}$  y AUBKC frente a Sma19, Sma9, Sma19M y Sma80M2. Frente a Sma19 exhibieron un patrón de actividad similar (AUBKC de 45-47 log UFC/ml,h) con recrecimientos bacterianos a partir del tiempo 10 horas ( $r_{\max}$  y  $r_{24h}$  de -5,3 y -2,7 para la dosis de 800 mg y -4,6 y -3,1 para la dosis de 400 mg/12h). Estos recrecimientos solo fueron observados con la dosis de 800 mg en los aislados Sma9, Sma19M y Sma80M2. El AUBKC, calculado en presencia de ambas dosis fue similar aunque de acuerdo a la medida de efecto antibacteriano  $r_{24h}$  la dosis de 400 mg/12 fue más efectiva que la dosis de 800 mg, que en comparación alcanzó un  $r_{\max}$  superior y a tiempos más tempranos.

La eficacia *in vitro* de las dosis de moxifloxacino de 400 y 800 mg no se vio modificada por la presencia del inhibidor de amplio espectro de las bombas de expulsión, PA $\beta$ N (tabla 42).

**Tabla 42.** Efecto de moxifloxacino en presencia del inhibidor Phe-Arg- $\beta$ -naftilamida

Cepa <sup>a</sup> (CMI, $\mu\text{g/ml}$ )	Dosificación*		Recuento de viables (log UFC/ml)		AUBKC (log UFC/ml,h)	$T_{99,9}(\text{h})$
	mg	<i>n</i>	$r_{24h}$	$r_{\max}$		
Sma 51 (0,25)	400	3	-5,0 $\pm$ 0,7	-5,5 $\pm$ 0,2	23,7 $\pm$ 10,5	3,3 $\pm$ 1,1
	400+ PA $\beta$ N	3	-4,2 $\pm$ 0,8	-4,9 $\pm$ 0,6	21,5 $\pm$ 7,7	3,3 $\pm$ 1,1
Sma80 (0,5)	400	5	-3,6 $\pm$ 0,8	-5,5 $\pm$ 0,3	30,9 $\pm$ 8,5	3,6 $\pm$ 1,7
	400+ PA $\beta$ N	5	-3,0 $\pm$ 0,6	-5,4 $\pm$ 0,5	42,1 $\pm$ 4,4	3,6 $\pm$ 0,9
Sma19 (1)	400	5	-0,6 $\pm$ 0,5	-4,4 $\pm$ 0,7	64,3 $\pm$ 10,4	4,8 $\pm$ 1,8
	400+ PA $\beta$ N	5	-1,1 $\pm$ 0,1	-4,1 $\pm$ 0,8	70,8 $\pm$ 8,1	6,5 $\pm$ 1,0
	800	4	-2,7 $\pm$ 0,6	-5,3 $\pm$ 0,6	47,2 $\pm$ 4,4	4,5 $\pm$ 1
	800+ PA $\beta$ N	3	-2,6 $\pm$ 0,6	-4,9 $\pm$ 0,3	45,8 $\pm$ 2,0	6
Sma9 (2)	400	5	-1,2 $\pm$ 0,9	-3,4 $\pm$ 0,3	80,8 $\pm$ 13,7	5,7 $\pm$ 1,5
	400+ PA $\beta$ N	3	-1,9 $\pm$ 0,19	-3,2 $\pm$ 0,1	77,1 $\pm$ 2,0	6
	800	6	-3,3 $\pm$ 0,3	-4,7 $\pm$ 0,5	52,1 $\pm$ 12,9	5,7 $\pm$ 1,5
	800+ PA $\beta$ N	3	-3,7 $\pm$ 0,1	-5,2 $\pm$ 0,4	57,5 $\pm$ 3,0	4
Sma19M (4)	400	3	-0,5 $\pm$ 0,5	-2,1 $\pm$ 0,1	108,0 $\pm$ 13,1	>24
	400+ PA $\beta$ N	3	0,4 $\pm$ 0,2	-1,6 $\pm$ 0,1	103,4 $\pm$ 0,1	>24
	800	3	-0,8 $\pm$ 0,2	-1,6 $\pm$ 0,1	90,2 $\pm$ 6,4	9 $\pm$ 1,4
	800+ PA $\beta$ N	3	-0,7 $\pm$ 0,1	-3,2 $\pm$ 0,1	77,4 $\pm$ 1,5	8
Sma80M2 (8)	400	4	-0,3 $\pm$ 0,4	-2,8 $\pm$ 1,1	118,2 $\pm$ 5,3	>24
	400+ PA $\beta$ N	3	-0,2 $\pm$ 0,1	-1,3 $\pm$ 0,4	119,3 $\pm$ 1,1	>24
	800	3	-0,7 $\pm$ 0,1	-3,0 $\pm$ 0,2	108,8 $\pm$ 0,5	>24
	800+ PA $\beta$ N	3	-0,4 $\pm$ 0,3	-1,6 $\pm$ 1,1	115,0 $\pm$ 5,9	>24

<sup>a</sup>CMI a las 48 h, \*intervalo de dosis cada 24 horas. PA $\beta$ N ; Phe-Arg- $\beta$ -naftilamida ( $C_{\max}$  40  $\mu\text{g/ml}$ )  
(No existieron diferencias estadísticamente significativas,  $p > 0,05$ , en la actividad media ( $\Delta 24$  h o AUBKC (Ln) observada para cada dosis en presencia o ausencia del inhibidor de amplio espectro y para cada uno de los niveles de sensibilidad, mediante el ajuste de Bonferroni para las comparaciones múltiples del modelo lineal de efectos mixtos)

#### 4.6.4 Análisis del efecto antibacteriano

Como se muestra en la tabla 43, la dosis, la CMI del microorganismo y la presencia del inhibidor explicaron el 91% del efecto de moxifloxacin cuantificado en forma de AUBKC (LnAUBKC) y el 89% en forma de r24h. El modelo lineal de efecto mixto generado con las tres variables y sus combinaciones estimó que el efecto antibacteriano medio, es significativamente diferente entre las diferentes dosis simuladas ( $p < 0,001$ ), significativamente diferente entre niveles de CMI ( $p < 0,001$ ), pero no entre la presencia o ausencia del inhibidor ( $p = 0,27-0,59$ ). El análisis de las interacciones mostró que el efecto de moxifloxacin fue significativamente diferente para cada dosis en función de la CMI del microorganismo, (interacción dosis\*CMI  $p \leq 0,01$ ). No se observaron diferencias significativas en el efecto de moxifloxacin entre las dosis combinadas y no combinadas con el inhibidor (interacción dosis\*inhibidor), en la presencia o ausencia del inhibidor para cada nivel de CMI (interacción inhibidor\*CMI) o en el efecto entre dosis combinadas y no combinadas con el inhibidor en los diferentes niveles de CMI (interacción dosis\*inhibidor\*CMI).

**Tabla 43.** Parámetros estimados por el modelo lineal de efecto mixto factorial para la respuesta antibacteriana en función de los factores e interacciones descritas.

Factores e interacciones*	Efecto antibacteriano:			
	LnAUBKC		r24h	
	Media cuadrática	<i>p</i>	Media cuadrática	<i>p</i>
Modelo corregido	1,97	<b>0,00</b>	12,74	<b>0,00</b>
Intersección	1036,99	<b>0,00</b>	586,67	<b>0,00</b>
Dosis	2,66	<b>0,00</b>	37,96	<b>0,00</b>
PAβN	0,01	0,59	0,49	0,27
CMI	7,46	<b>0,00</b>	43,47	<b>0,00</b>
Dosis*PAβN	0,00	0,95	0,02	0,80
Dosis*CMI	0,12	<b>0,01</b>	1,82	<b>0,00</b>
PAβN*CMI	0,05	0,43	0,59	0,20
Dosis* PAβN*CMI	0,01	0,85	0,25	0,61
<i>r</i> <sup>2</sup>		<b>0,91</b>		<b>0,89</b>

\*CMI a las 48h, PAβN; Phe-Arg-β-naftilamida

Debido a que las estimaciones de algunas interacciones, especialmente las que contenían al inhibidor pudieron estar sesgadas debido a la falta de balanceo del estudio (no todos los casos posibles para una interacción combinaron a las variables de la interacción simultáneamente, por ejemplo la interacción inhibidor\*CMI comparó la sumatoria de efectos de las dosis combinadas con el inhibidor, 400 mg-PAβN + 800 mg-PAβN, con de la sumatoria de efectos de las dosis simuladas en su ausencia, 200, 400, 400/12h y 800 mg) se generó un nuevo modelo lineal de efecto mixto balanceado, donde se incluyeron exclusivamente los valores de CMI y dosis valorados en presencia del inhibidor. Las conclusiones no sufrieron cambios, confirmando que el efecto del inhibidor sobre el LnAUBKC o r24h, no es diferente entre las dosis administradas y que su efecto en los diversos niveles de sensibilidad no contribuye a la respuesta resultante.

Todas estas presunciones fueron satisfechas mediante la interpretación de los gráficos de perfil (figura 31). En la figura se muestran las medias marginales del efecto antimicrobiano, LnAUBKC



o  $r_{24h}$  extraídas del modelo lineal para las interacciones dosis\*CMI y dosis\*PA $\beta$ N\*CMI. En las figuras A y B se observa que las diferentes dosis exhiben un efecto medio diferente para cada nivel de CMI y una tendencia a agrupar las respuestas en las CMI más elevadas. El efecto antibacteriano disminuye (mayor LnAUBKC y  $r_{24h}$ ) conforme se reduce la dosis expuesta en un nivel de CMI y en general se satura cuando los niveles de resistencia del aislado son elevados. La superposición de las líneas de tendencia de las dosis de 800 mg y 400 mg/12h para el LnAUBKC nos orienta del equipotencial de ambas dosificaciones para esos valores de CMI. Como se observa en la figura C y D, las líneas de tendencia de cada dosis combinada o sin combinar con el inhibidor se superponen demostrando que el efecto antibacteriano fue diferente en función de la dosis y de la CMI del microorganismo pero no por la presencia del inhibidor. Este comportamiento fue idéntico en las interacciones dosis\*inhibidor e inhibidor\*CMI (datos no mostrados).

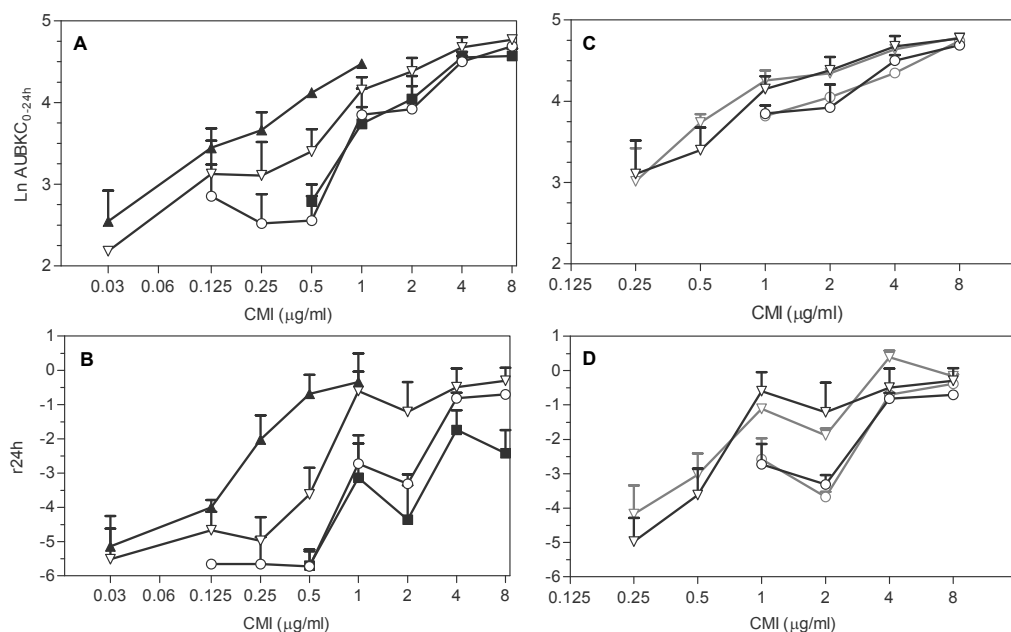
La comparación múltiple de la interacción dosis\*CMI (tabla 41) reveló que el AUBKC generado por la dosis de 400 mg fue significativamente inferior (dosis más activa) al detectado con la dosis de 200 mg frente a cepas con valores de CMI comprendidos entre 0,06-0,5  $\mu$ g/ml. A su vez, las dosis de 800 mg y 400 mg/12h, fueron significativamente más activas (menor AUBKC) que la dosis de 400 mg para las cepas con valores de CMI desde 0,06-1  $\mu$ g/ml. No existieron diferencias de actividad (AUBKC) significativas entre las dosis de 800 mg y 400 mg/12h.

Con la medida de efecto antibacteriano  $r_{24h}$ , se observaron las mismas diferencias de actividad entre dosis para cada nivel de CMI, a excepción de; (i) las diferencias de actividad de las dosis de 800 mg o 400 mg/12h se ampliaron hasta las cepas con valores de CMI de 2  $\mu$ g/ml y (ii) la dosis de 400 mg/12h mostró diferencias estadísticamente significativas con el resto de dosis para las cepas más resistentes (CMI =4-8  $\mu$ g/ml).

La comparación múltiple de la interacción dosis\*PA $\beta$ N\*CMI, que se refleja en la tabla 41, confirmó que el efecto antibacteriano (en forma de LnAUBKC o  $r_{24h}$ ) atribuido a las dosis combinadas con el inhibidor, no fue diferente del efecto obtenido con las dosis en ausencia del inhibidor para cada uno de los niveles de sensibilidad estudiados ( $p>0,05$ ).

#### 4.6.5 Pronostico del efecto de moxifloxacino en la población total

El efecto antibacteriano, AUBKC o  $r_{24h}$ , se relacionó con la exposición de moxifloxacino, AUC/CMI,  $C_{max}$ /CMI y  $T_{>CMI}$ , empleando un modelo sigmoideo inhibitorio de efecto máximo (figura 32). Como se muestra en la figura ambas medidas de efecto se correlacionaron fuertemente con el AUC/CMI o la  $C_{max}$ /CMI aunque los ajustes con el AUBKC fueron significativamente más robustos que los ajustes con la  $r_{24h}$  (tabla 44). Ninguno de los posibles modelos examinados consiguió explicar razonadamente ( $r^2<0,65$ ) la relación entre el efecto y el índice  $T_{>CMI}$ . Ambas medidas se correlacionaron también satisfactoriamente con el AUC/CPM y el cociente  $C_{max}$ /CPM pero no con el  $T_{>CPM}$  (tabla 44)



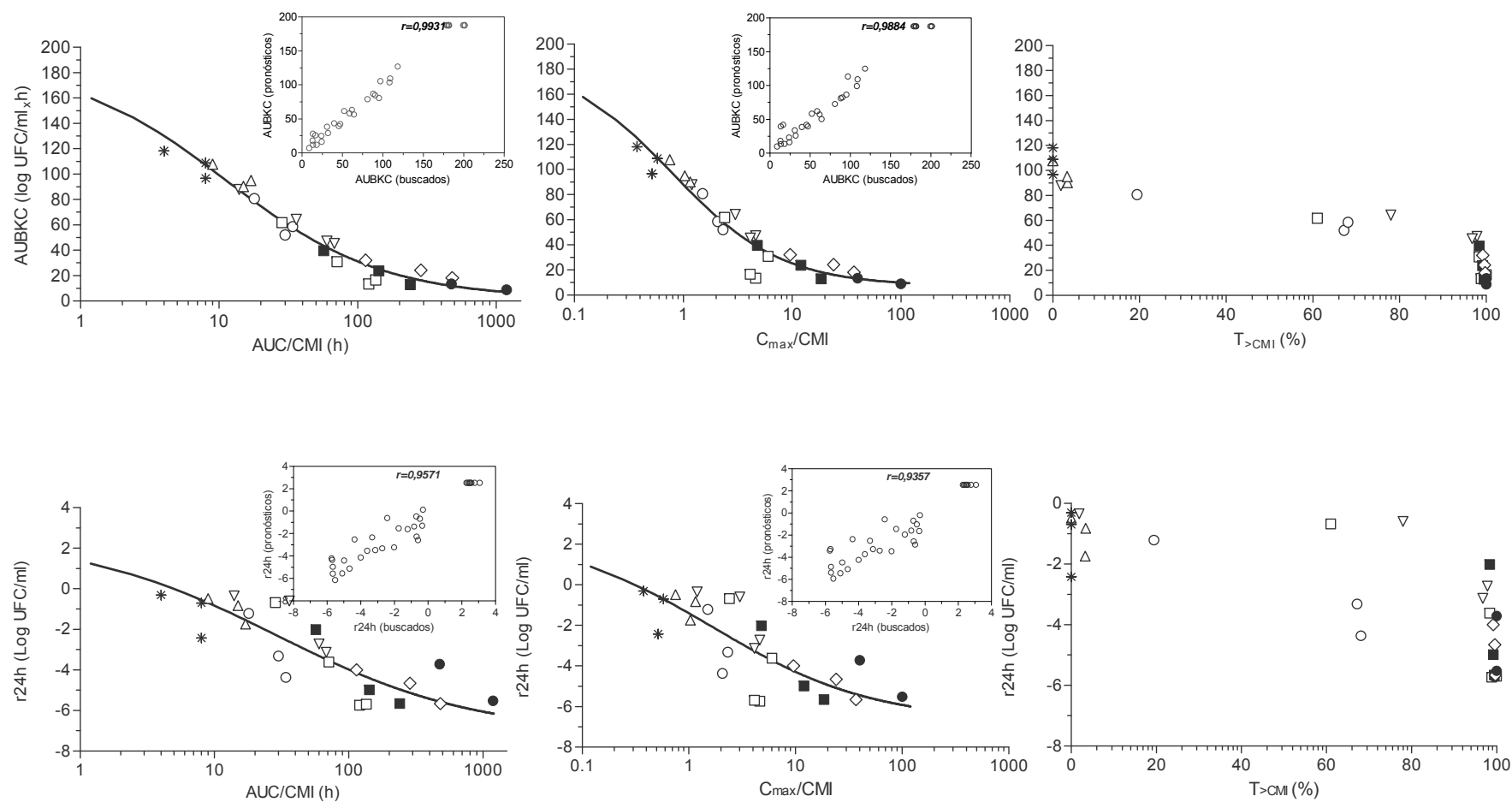
**Figura 31.** Medias marginales estimadas por el modelo lineal de efecto mixto balanceado y no balanceado

Gráficas A y B; Medias marginales estimadas con el modelo no balanceado para interacción dosis\*CMI, 200 mg/24 h (▲), 400 mg/24 h (▼), 800 mg/24 h (○) y 400 mg/12 h (■).

Gráficas C y D; Medias marginales estimadas con el modelo balanceado para la interacción dosis\*PAβN\*CMI, 400 mg/24 h (▼), 800 mg/24 h (○), 400 mg/24 h + PAβN (▼) y 800 mg/24 h + PAβN (○)

Los parámetros estimados por el modelo farmacodinámico se resumen en la tabla 44. De acuerdo al ajuste, el 50% del efecto máximo se alcanzaría con exposiciones muy bajas, equivalentes a un AUC/CMI ( $AUC/CMI_{50}$ ) de 11-23 horas o de  $C_{max}/CMI$  ( $C_{max}/CMI_{50}$ ) de 0,8-1,6 según la medida del efecto antibacteriano. Las magnitudes necesarias para conseguir el 80% y 90% del efecto antibacteriano fueron proporcionalmente más elevadas. El  $AUC/CMI_{80}$  y  $AUC/CMI_{90}$  estimado con el AUBKC fue de 63,8 horas y de 195,5 horas respectivamente y con la  $r_{24h}$  de 307,8 horas y 1.222,0 horas respectivamente. La  $C_{max}/CMI_{80}$  y  $C_{max}/CMI_{90}$  se estimó con el AUBKC en 3,9 y 10,1 y con la  $r_{24h}$  en 18,3 y 74,3 respectivamente. El cociente AUC/CMI asociado con la reducción del recuento de viables en 1, 2 y 3-log después de 24 horas de exposición ( $r_{24h}$ ) fue de 11,4, 23,6 y 47,8 horas.

Este cociente AUC/CMI se estimó en 10,9, 19,2 y 35,7 horas para la reducción equivalente en log UFC/ml<sub>h</sub>, es decir 96,2 (-1-log), 76,2 (-2-log), 56,3 (-3-log). Estas dianas se calcularon desde la recta de regresión entre el AUBKC y la  $r_{24h}$  (figura 33).



**Figura 32.** Relación del efecto antibacteriano (AUBKC o  $r_{24h}$ ) de moxifloxacin con los índices FC/FD, AUC/CMI,  $C_{max}/CMI$  y  $T_{>CMI}$  mediante modelos de efecto máximo

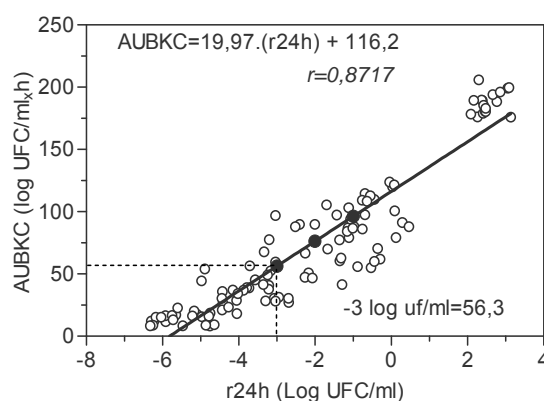
**Tabla 44.** Parámetros de la ecuación de Hill para las interacciones entre los diferentes índices FC/FD y las respuestas antibacterianas en la forma del AUBKC y el r24h

	$E_{max}$	$E_0$	$EC_{50}$	$s$	$r^2$
AUBKC vs.					
AUC/CMI	187,8±2,9	2,1±6,8	11,3±1,4	0,8±0,1	0,9931
$C_{max}$ /CMI	187,6±3,7	7,2±7,1	0,8±0,1	0,8±0,1	0,9884
AUC/CPM	187,7±4,0	2,5±9,1	2,3±0,3	0,8±0,1	0,9865
$C_{max}$ /CPM	187,9±3,9	5,8±8,0	0,2±0,0	0,9±0,2	0,987
r24h vs.					
AUC/CMI	2,5±0,3	-7,1±1,6	29,2±18,9	0,6±0,2	0,9571
$C_{max}$ /CMI	2,5±0,4	-6,7±1,7	1,7±1,2	0,6±0,2	0,9357
AUC/CPM	2,5±0,3	-6,3±0,8	4,2±1,2	0,8±0,2	0,9699
$C_{max}$ /CPM	2,5±0,3	-6,3±0,9	0,3±0,1	0,7±0,2	0,9606

$E_{max}$ ; efecto máximo,  $E_0$ ; efecto mínimo,  $EC_{50}$ ; concentración del índice FC/FD necesaria para conseguir el 50% del  $E_{max}$  y  $s$ ; constante de sigmoicidad de Hill

Las diferencias encontradas en las magnitudes de los índices FC/FD asociadas a un efecto particular se explicaron por la diferente fortaleza del ajuste y la reproducibilidad y variabilidad de las medidas del efecto antimicrobiano en la serie estudiada:

El AUBKC se cuantificó en todos los casos ( $n=35$ ) a diferencia de la r24h donde 4 relaciones se situaron por debajo del límite de detección y fue menos variable entre repeticiones, %CV medio: 16,8, mediana 12,1 (0-48) que la r24h, %CV medio: 43,3, mediana 23,6 (1,1-243,7).

**Figura 33.** Relación lineal entre el AUBKC y la r24h

#### 4.6.6 Identificación del índice FC/FD dominante

A pesar del uso de múltiples dosis sobre un amplio rango de sensibilidades, las magnitudes generadas para los tres índices FC/FD, AUC/CMI,  $C_{max}$ /CMI,  $T_{>CMI}$  mostraron un fuerte relación lineal. La correlación ( $r$  de Spearman) entre el AUC/CMI y  $C_{max}$ /CMI, AUC/CMI y  $T_{>CMI}$  o  $C_{max}$ /CMI y  $T_{>CMI}$  fue de 0,9854, 0,9784, y 0,9896 respectivamente. Con esta elevada linealidad fue imposible atribuir el efecto de moxifloxacino a una variable FC/FD concreta. El análisis de regresión lineal múltiple, tanto con la selección de variables hacia delante y hacia atrás encontró que el logAUC/CMI y el  $T_{>CMI}$ , pero no el log $C_{max}$ /CMI ( $p=0,33$ ) explicaron el 95,3% de la respuesta antimicrobiana obtenida en forma de AUBKC y que el logAUC/CMI y log $C_{max}$ /CMI, pero no el  $T_{>CMI}$  ( $p=0,93$ ) explicaron el 79% de la respuesta antibacteriana en forma de r24h (tabla 45).

**Tabla 45.** Análisis de regresión lineal

AUBKC			r24h		
Variable	Coeficiente	I.C.95%	Variable	Coeficiente	I.C.95%
AUC/CMI	-32,48	-42,16,-22,80	AUC/CMI	-14,195	-21,44,-6,952
T <sub>&gt;CMI</sub>	0,315	-0,458,-0.171	C <sub>max</sub> /CMI	11,53	4,39,-18,67
Constante	132,43	121,75,143,17	Constante	14,59	6,43,22,74

Sin embargo en ambos casos el modelo generado señaló que la variable AUC/CMI presentó un peso determinante en la respuesta. El T<sub>>CMI</sub>, aunque de forma significativa, tan solo explicó un 4% de la respuesta en forma de AUBKC ( $r^2=0,91$  vs. 0,95 cuando se introducen ambas variables) y el logC<sub>max</sub>/CMI aproximadamente el 10% de la respuesta en forma de r24h.

Para confirmar el peso determinante del cociente AUC/CMI en la respuesta se generó una nueva aproximación con respuestas donde la correlación de los tres índices FC/FD se reduce sustancialmente. La selección de las respuestas de las dosis de 800 mg en dosis única y de la dosis total fraccionada en dos dosis administradas cada 12 horas originaron cambios limitados en el AUC/CMI o C<sub>max</sub>/CMI y muy pronunciados en el T<sub>>CMI</sub> (AUC/CMI vs. C<sub>max</sub>/CMI  $r=0,98$ , AUC/CMI vs. T<sub>>CMI</sub>  $r=0,81$ , C<sub>max</sub>/CMI vs. T<sub>>CMI</sub>  $r=0,71$ ). De acuerdo a estos datos el modelo sugirió que el AUC/CMI es la única variable que pronostica el efecto antibacteriano (AUBKC y r24h). La incorporación del T<sub>>CMI</sub> o del C<sub>max</sub>/CMI al modelo no mejora el ajuste de manera significativa.

#### 4.6.7 Efecto de moxifloxacino en las subpoblaciones resistentes

Antes de la exposición a moxifloxacino un sustancial número de células de Sma18, Sma51, Sma80, Sma19, Sma9, Sma19M y Sma80M sobrevivieron a concentraciones superiores a la CMI (tabla 46). Fue frecuente encontrar organismos a concentraciones de entre 2-4xCMI e incluso 8xCMI (Sma19). A diferencia del resto, la población de Sma22 fue muy homogénea con muy pocos organismos inhibidos a concentraciones de CMI. La distribución de estas subpoblaciones resistentes dentro de la población (PAP basal o PAP<sub>i</sub>) se exponen la tabla 46. El AUC-PAP calculado para estas distribuciones (AUC-PAP<sub>i</sub> o basal) se resume en la tabla 47.

Como se muestra en la tabla 46, la exposición a moxifloxacino ejerció un efecto específico en las subpoblaciones bacterianas preexistentes, sensibles y resistentes dependiendo de la dosis que se expuso y de la CMI del microorganismo (PAP<sub>r</sub>).

La dosis de 200 mg fue suficiente para eliminar la práctica totalidad de la población en Sma22 (CMI=0,03 µg/ml) y reducir hasta el límite de detección el AUC-PAP (tabla 47. En cambio en los aislados con una CMI=0,12-0,5 µg/ml (Sma18, Sma51, Sma80) la dosis de 200 mg seleccionó específicamente a las subpoblaciones de entre 4-16xCMI aumentando el AUC-PAP basal de 1,3 a 5 veces, pero exhibió un leve o moderado efecto en la población total (subpoblaciones sensibles). Dosis superiores redujeron progresivamente las subpoblaciones resistentes y el AUC-PAP y aumentaron progresivamente el efecto antimicrobiano en la población total.

**Tabla 46.** Análisis del perfil de distribución de la población, PAP, antes PAP<sub>i</sub> y después PAP<sub>f</sub> de la exposición a un régimen de dosis de moxifloxacino

Cepa (CMI*, µg/ml)	Concentración placa xCMI	Células viables (log UFC/ml) a los tiempos y regímenes indicados				
		PAP <sub>i</sub>	PAP <sub>f</sub>			
			200 mg/24 h	400 mg/24 h	800 mg/24 h	400 mg/12h
Sma22 (0,03)	0	7,3 ± 0,3	1,8 ± 0,6	1,3 ± 0	1,3 ± 0	ND
	1	4,8 ± 0,2	<1	<1	<1	ND
	2	<1				ND
Sma18 (0,12)	0	7,2 ± 0,1	3,2 ± 0,3	2,4 ± 0,7	1,5 ± 0,2	ND
	1	3,0 ± 0,4	3,4 ± 0,2	2,0 ± 1,4	<1	ND
	2	2,7 ± 0,4	3,3 ± 0,1	1,6 ± 0,8		ND
	4	2,0 ± 0,2	3,3 ± 0,1	<1		ND
	8	<1	3,0 ± 0,3			ND
	16		<1			ND
Sma51 (0,25)	0	7,1 ± 0,3	4,7 ± 0,5	1,9 ± 0,6	1,5 ± 0,0	ND
	1	3,3 ± 0,5	4,6 ± 0,5	2,0 ± 0,3	<1	ND
	2	3,0 ± 0,6	4,7 ± 0,5	2,0 ± 0,2		ND
	4	1,8 ± 0,8	4,5 ± 0,6	<1		ND
	8	<1	3,1 ± 1,5			ND
	16		1,4 ± 0,7			ND
Sma80 (0,5)	0	7,3 ± 0,2	6,3 ± 0,3	3,3 ± 0,5	1,5 ± 0,4	1,5 ± 0,2
	1	3,2 ± 1,5	6,0 ± 0,4	3,0 ± 0,1	<1	<1
	2	1,5 ± 0,3	5,9 ± 0,4	2,9 ± 0,5		
	4	1,2 ± 0,4	5,5 ± 0,1	2,8 ± 0,4		
	8	<1	2,3 ± 0,2	1,8 ± 0,0		
	16		<1	<1		
Sma19 (1)	0	7,0 ± 0,2	6,4 ± 0,5	6,2 ± 0,7	4,2 ± 0,5	3,7 ± 1,0
	1	3,9 ± 0,6	4,3 ± 0,4	6,1 ± 0,6	4,6 ± 0,1	4,0 ± 0,0
	2	3,0 ± 0,5	3,0 ± 0,5	5,9 ± 0,4	4,1 ± 0,3	3,9 ± 0,1
	4	1,6 ± 0,6	2,7 ± 0,1	5,2 ± 1,3	4,0 ± 0,2	3,8 ± 0,1
	8	1,4 ± 0,7	1,7	4,5 ± 1,2	3,5 ± 0,2	2,6 ± 0,3
	16	<1	<1	1,6 ± 1,0	2,4 ± 0,1	2,6 ± 0,4
Sma9 (2)	0	7,3 ± 0,3	ND	5,7 ± 1,1	3,7 ± 0,5	2,9 ± 0,5
	1	3,3 ± 1,1	ND	3,6 ± 0,2	4,1 ± 0,5	2,9 ± 0,1
	2	2,5 ± 0,3	ND	3,8 ± 0,1	3,9 ± 0,5	3,0 ± 0,2
	4	1,4 ± 0,1	ND	3,9 ± 0,3	3,5 ± 0,2	3,1 ± 0,2
	8	<1	ND	1,3 ± 0,1	3,4 ± 0,5	3,0 ± 0,1
	16		ND	<1	<1	2,3 ± 0,9
Sma19M (4)	0	7,0 ± 0,2	ND	6,5 ± 0,5	6,1 ± 0,2	5,0 ± 0,7
	1	6,7 ± 0,2	ND	6,3 ± 0,1	5,7 ± 0,3	3,9 ± 0,7
	2	4,4 ± 1,7	ND	3,4 ± 0,3	3,2 ± 0,4	3,3 ± 0,8
	4	2,7 ± 1,1	ND	2,0 ± 0,1	1,7 ± 0,5	2,7 ± 1,5
	8	<1	ND	<1	<1	2,0 ± 1,4
	16		ND			<1
Sma80M2 (8)	0	7,3 ± 0,3	ND	7,2 ± 0,6	6,2 ± 0,0	4,9 ± 0,9
	1	6,7 ± 0,3	ND	7,0 ± 0,2	4,5 ± 1,1	3,2 ± 0,8
	2	6,0 ± 0,9	ND	2,5 ± 0,3	2,1 ± 1,1	2,1 ± 1,5
	4	1,5 ± 0,2	ND	<1	<1	<1
	8	<1	ND			
	16		ND			

\*CMI a las 48 h

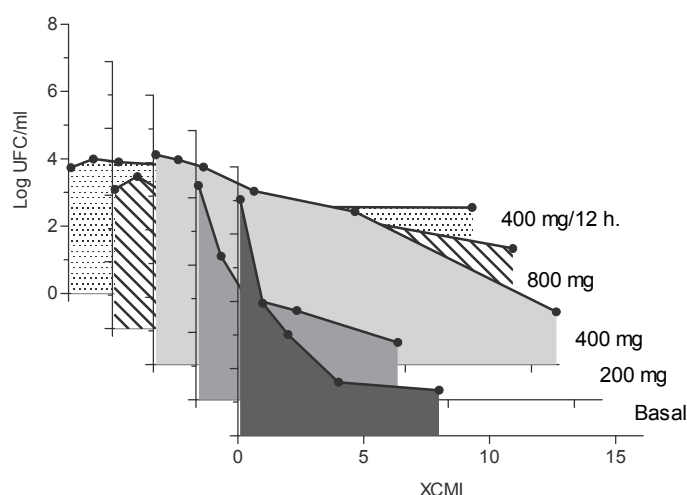
En las cepas de CMI = 1-2 µg/ml la dosis de 200 mg (solo se ensayó en Sma19) prácticamente no modificó la distribución o AUC-PAP basal pero no originó un efecto significativo en la población sensible. El aumento de la dosis aumentó progresivamente el efecto antimicrobiano en la población total (sensible) pero favoreció la selección de las subpoblaciones resistentes de 4x-16xCMI originando un aumento del AUC-PAP basal de 2,5 a 3 veces (tabla 47, figura 34)

En las cepas con una CMI =4-8 µg/ml (Sma19M y Sma80M2) ninguna de las dosis originó cambios relevantes en la distribución basal de la población o un efecto pronunciado en la población total. En Sma80M2 la reducción de las subpoblaciones resistentes fue más intensa.

**Tabla 47.** Área bajo la curva del perfil del análisis poblacional, AUC-PAP, antes AUC-PAP<sub>i</sub> y después AUC-PAP<sub>f</sub> de la administración de diferentes dosis de moxifloxacino.

Cepa (CMI*, µg/ml)	AUC-PAP <sub>i</sub>	AUC-PAP <sub>f</sub>			
		200 mg/24 h	400 mg/24 h	800 mg/24 h	400 mg/12h
Sma 22 (0,03)	6,0 ± 0,1	<1	<1	<1	ND
Sma18 (0,125)	13,0 ± 0,35	25,7 ± 1,3	4,0 ± 1,8	<1	ND
Sma51 (0,25)	13,1 ± 1,9	51,6 ± 13,2	4,0 ± 0,4	<1	ND
Sma80 (0,5)	10,4 ± 2,3	39,0 ± 0,9	16,7 ± 6,8	<1	<1
Sma19 (1)	19,5 ± 4,6	23,4 ± 0,9	67,0 ± 15,2	55,3 ± 2,7	48,8 ± 3,8
Sma9 (2)	12,2 ± 1,5	ND	26,6 ± 1,5	29,1 ± 0,3	44,7 ± 2,2
Sma19M (4)	19,5 ± 3,5	ND	16,7 ± 0,7	15,3 ± 0,5	23,5 ± 9,1
Sma80M2 (8)	20,8 ± 0,9	ND	11,8 ± 0,4	8,6 ± 1,6	6,8 ± 1,5

\*CMI a las 48 h



**Figura 34.** Representación del AUC-PAP calculado para la cepa Sma19 antes y después de la exposición a moxifloxacino

Estos efectos en las subpoblaciones bacterianas sensibles y resistentes se agruparon en tres patrones de actividad característicos. Un patrón relacionado con una pronunciada reducción de las subpoblaciones sensibles y resistentes basales y el AUC-PAP, acompañado de una pronunciada actividad en la población total, característico de cualquier dosis en Sma22, dosis de 400 mg y 800 mg en Sma18 y Sma51 o de las dosis de 800 mg o 400 mg/12 horas en Sma80.

Otro patrón estaría relacionado con una moderada o fuerte actividad antimicrobiana sobre las subpoblaciones sensibles, acompañada de un fuerte aumento de las subpoblaciones resistentes y del AUC-PAP, característico de la dosis de 200 mg en Sma18, Sma51, Sma80 o de la dosis de 400 mg en Sma80 o de la dosis de 400 mg, 800 mg y 400 mg/12h en Sma19 o Sma9).

Un tercer patrón estaría caracterizado por un efecto leve o moderado en la población total sin cambios sustanciales en la distribución de las poblaciones resistentes basales o AUC-PAP basal,

característico de la dosis de 200 mg en Sma19, dosis de 400 mg en Sma80 y cualquier dosis en Sma19M y Sma80M.

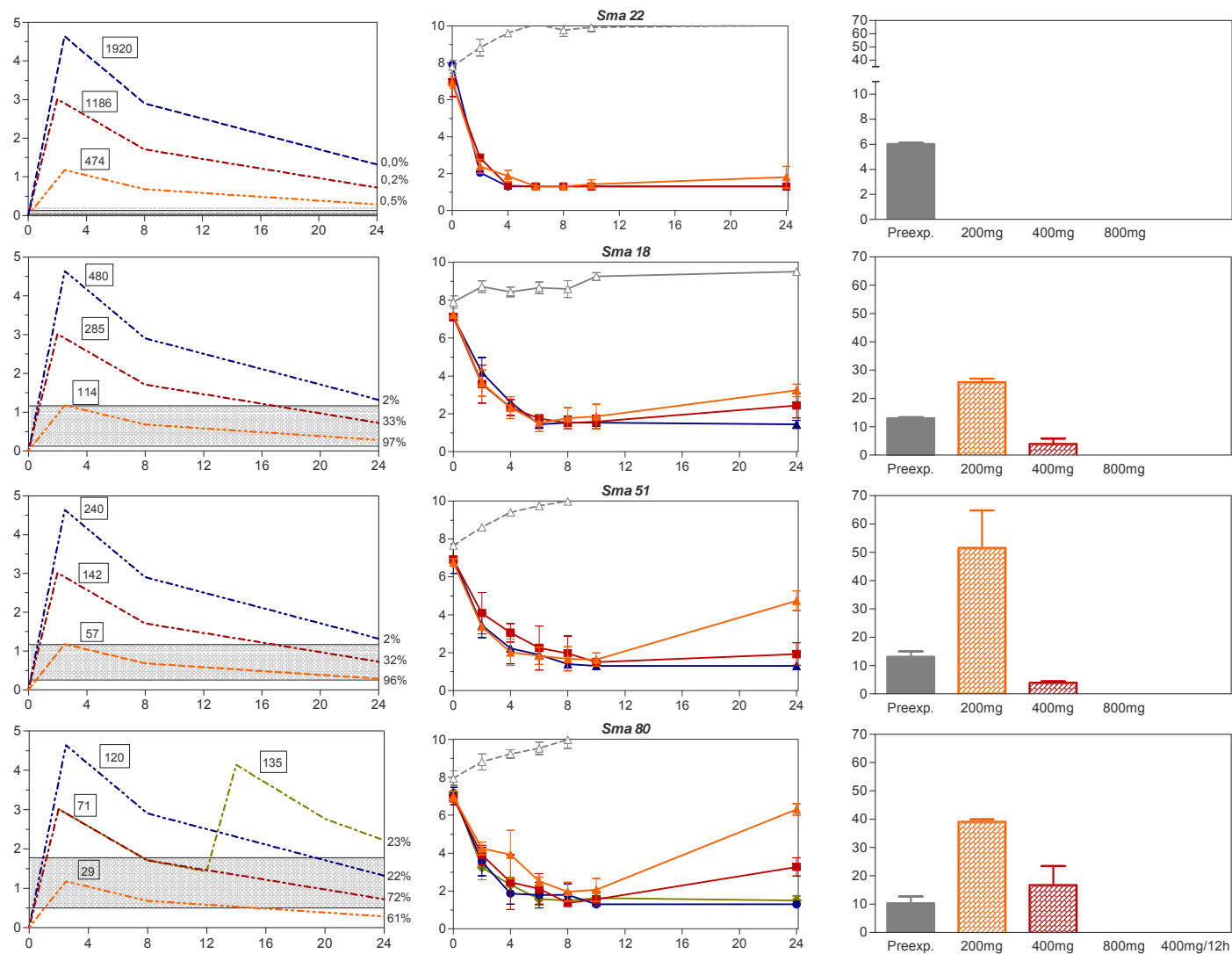
#### **4.6.8 Selección de subpoblaciones resistentes dentro de la ventana de selección de mutaciones**

Los patrones de actividad comentados anteriormente se explicaron razonadamente a través de la hipótesis de la ventana de selección de mutaciones (VSM). Como se muestra en las figuras 35 y 36 la amplificación de subpoblaciones resistentes fue más probable cuando las dosis expuestas recayeron en el intervalo de concentraciones definido por la CMI y la CPM del microorganismo y más intensa conforme aumentó la cantidad de moxifloxacino que se expuso dentro del intervalo sugerido y o el tiempo que las concentraciones permanecieron dentro del mismo. Las concentraciones de moxifloxacino alcanzadas con la dosis de 200 mg en las cepas Sma18, Sma51, y Sma80 o con la dosis de 400 mg en Sma80 (figura 35) o con las dosis de 400 mg, 800 mg y 400 mg/12h en las cepas Sma19 y Sma9 (figura 36), es decir cocientes AUC/CMI de entre 18 y 114 horas, se situaron total o parcialmente dentro de las ventanas de selección de mutantes en un porcentaje superior al 33% del periodo de dosificación. Estas exposiciones se relacionaron con fuertes incrementos en el AUC-PAP y un fuerte efecto antimicrobiano inicial seguido de más (AUC/CMI <30 horas) o menos (AUC/CMI ≥30 horas) intensos recrecimientos en la población total.

Las concentraciones de moxifloxacino en cambio para las dosis de 200 mg, 400 mg y 800 mg en Sma22, las dosis de 400 mg y 800 mg en Sma18 y Sma51 las dosis de 800 mg y 400 mg/12h Sma80 (figura 35), o cocientes AUC/CMI ≥120 horas, se dispusieron mayoritariamente por encima de la CPM o límite superior de la VSM, es decir permanecieron dentro de VSM ( $T_{VSM}$ ) ≤32% del periodo de dosificación. Estas exposiciones originaron AUC-PAP inferiores a los basales y efectos pronunciados en la población total.

Al contrario, las concentraciones de moxifloxacino para la dosis de 200 mg en Sma19, o las dosis de 400 mg, 800 mg y 400 mg/12h en las cepas Sma19M y Sm80M (figura 36), o cocientes AUC/CMI ≤17 horas, se situaron por debajo o muy próximas al límite inferior de la VSM, es decir dentro de la VSM en un porcentaje inferior al 18% del periodo de dosificación, originando AUC-PAP muy similares o incluso inferiores al basal y efectos en la población poco relevantes. Cuanto más próxima se situó la  $C_{max}$  de la CMI mayor efecto en la subpoblaciones resistentes.





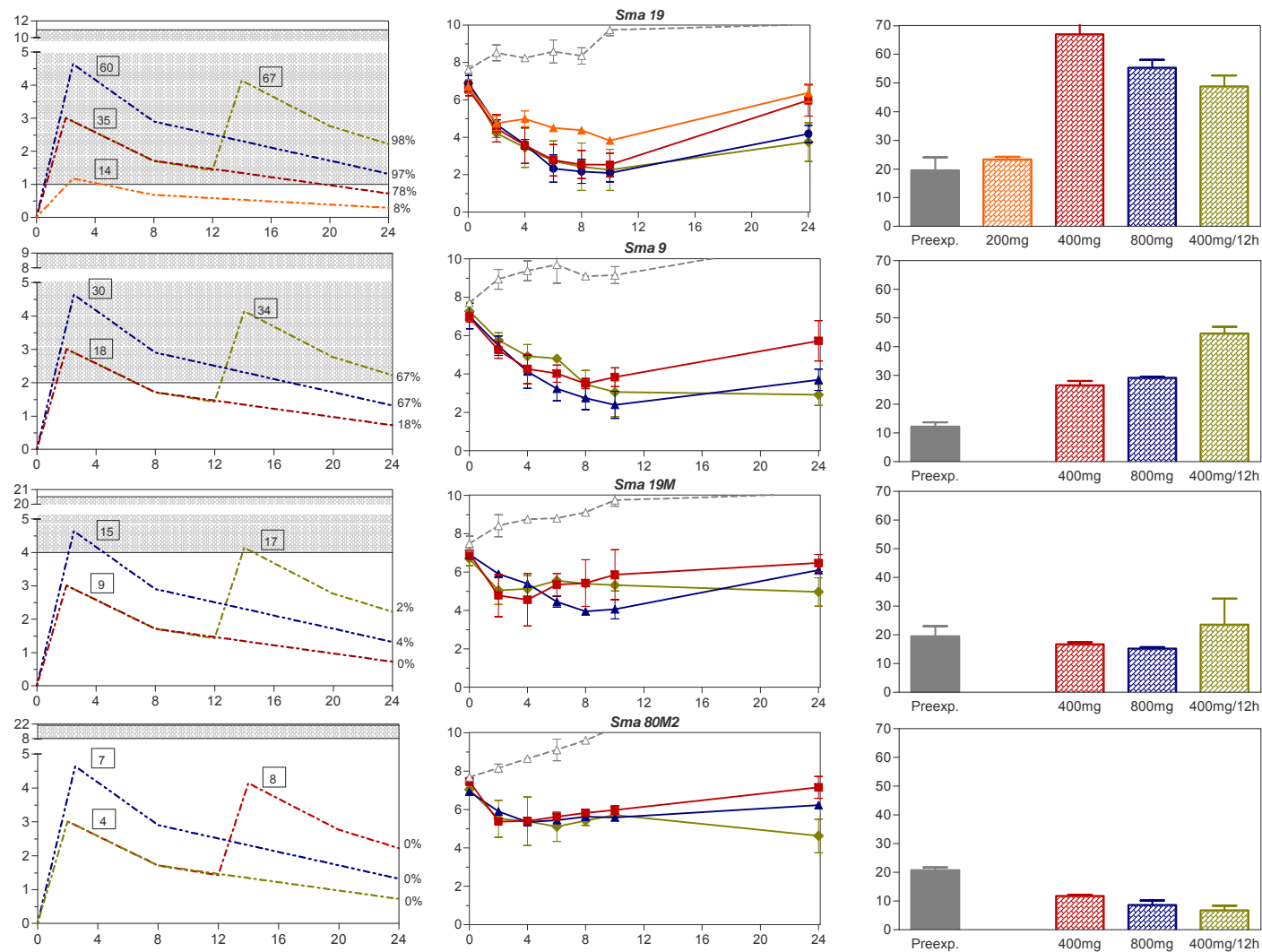
**Figura 35.** Efecto antibacteriano de moxifloxacino en las subpoblaciones sensibles y resistentes de las cepas Sma22, Sma18, Sma51 y Sma80.

Izquierda: Dosis simuladas. La VSM (área coloreada) está limitada por la CMI (línea inferior) y CPM (línea superior). El cociente AUC/CMI aparece en el recuadro de cada perfil. El  $TV_{SM}$  aparece en el extremo derecho.

Centro: Evolución del recuento de microorganismos viables. Representa a la población total, sensible y resistente, detectada en placas de agar libre de moxifloxacino.

Derecha, AUC-PAP basal (preexp.) y AUC-PAP tras la exposición a cada dosis. Representa la selección de subpoblaciones resistentes durante el tratamiento in vitro.

Dosis de 200 mg; naranja. Dosis de 400 mg; rojo. Dosis de 800 mg; azul. Dosis de 400 mg cada 12 horas; ocre.



**Figura 36.** Efecto antibacteriano de moxifloxacin en las subpoblaciones sensibles y resistentes de las cepas Sma19, Sma9, Sma19M y Sma80M2. Izquierda: Dosis simuladas. La VSM (área coloreada) está limitada por la CMI (línea inferior) y CPM (línea superior). El cociente AUC/CMI aparece en el recuadro de cada perfil. El  $T_{VSM}$  aparece en el extremo derecho. Centro: Evolución del recuento de microorganismos viables. Representa a la población total, sensible y resistente, detectada en placas de agar libre de moxifloxacin. Derecha, AUC-PAP basal (preexp.) y AUC-PAP tras la exposición a cada dosis. Representa la selección de subpoblaciones resistentes durante el tratamiento in vitro. Dosis de 200 mg; naranja. Dosis de 400 mg; rojo. Dosis de 800 mg; azul. Dosis de 400 mg cada 12 horas; ocre.

#### 4.6.9 Pronostico del efecto de moxifloxacino en las subpoblaciones resistentes

El cambio en el recuento de organismos viables en las placas suplementadas con 2xCMI, 4xCMI y 8xCMI ( $N_i/N_x$ ) y el cambio en el AUC-PAP ( $AUC-PAP_i/AUC-PAP_j$ ) antes y después de la exposición se relacionó satisfactoriamente con el cociente AUC/CMI empleando un modelo tipo Gauss. Ninguno de los modelos basados en la ecuación de Hill consiguió un ajuste óptimo de los datos (datos no mostrados). Dado que cocientes AUC/CMI similares originaron modificaciones en la distribución de la población resistente muy parecidas, los datos de las diferentes cepas fueron superpuestas en único modelo.

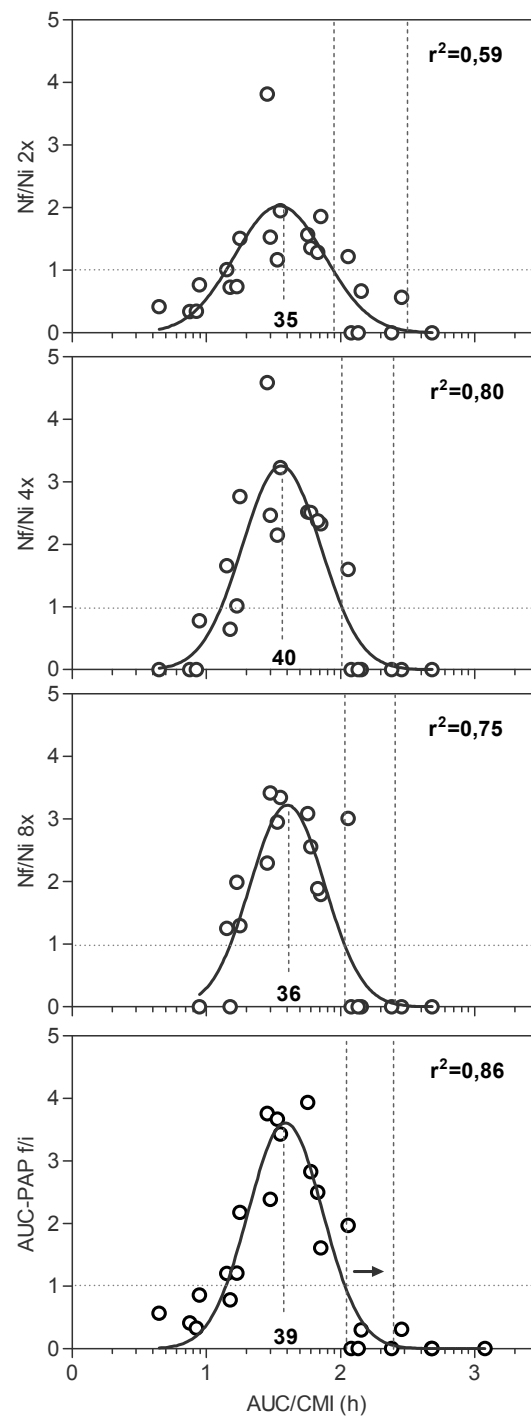
Como se muestra en la figura 37, el ajuste del modelo fue más robusto con el AUC-PAP,  $r^2=0,86$  que con cualquiera de las medidas basadas en el cambio de viables en una subpoblación específica, especialmente con el  $N_i/N_{2X}$ ,  $r^2=0,59$ . No obstante las estimaciones obtenidas empleando el AUC-PAP o el  $N_i/N_{4x}$  o  $N_i/N_{8x}$  fueron muy similares.

Ambos tipos de medidas demostraron una variabilidad muy similar (%CV 9,7-11) pero la reproducibilidad del  $N_i/N_{4x}$  o  $N_i/N_{8x}$  fue inferior debido a la ausencia de subpoblaciones resistentes específicas en algunos de los casos estudiados.

Empleando el AUC-PAP el modelo estimó que la máxima selección de resistencias ocurriría con exposiciones de moxifloxacino equivalentes a un AUC/CMI de 38 horas y que la probabilidad de seleccionar subpoblaciones resistentes aumenta en el intervalo de exposiciones comprendido entre las 14,0 y 107,8 horas. Cocientes de AUC/CMI  $\geq 240$  horas se asociarían con la supresión del microorganismo.

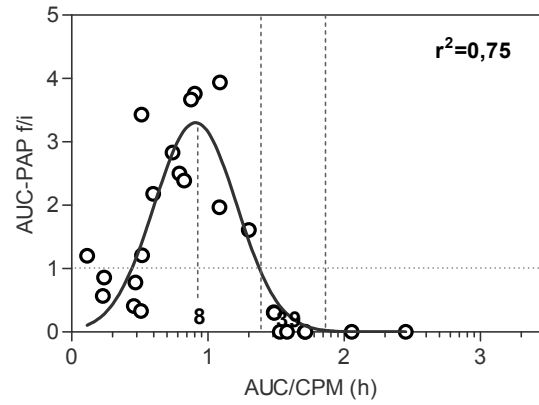
El ajuste entre el cociente AUC/CPM y el cambio en el AUC-PAP fue también adecuado (figura 38). En este caso el modelo estimó que la selección de resistencias es máxima con cocientes AUC/CPM de 8 horas y la probabilidad de seleccionar resistencias se reduce cuando el cociente es superior a 23,8 horas.

La relación entre la selección de resistencias y el tiempo que las concentraciones de moxifloxacino permanecieron dentro de la VSM ( $T_{VSM}$ ) se muestra en la figura 39. A diferencia del AUC/CMI, la representación gráfica del  $T_{VSM}$  frente al AUC-PAP fue más dispersa y el ajuste de los datos empleando ecuaciones de tipo sigmoideo muy pobre ( $r^2=0,35$ ), figura 39A. No obstante, esta figura representa la estratificación lineal de los datos de resistencia procedentes de las ramas ascendente y descendente de la curva AUC/CMI-AUC-PAP (figura 37) y asume que las exposiciones con un  $T_{VSM}$  idéntico en ramas distintas son microbiológicamente equivalentes. Por ejemplo, la rama ascendente incluye  $T_{VSM}$  de exposiciones situadas por debajo de la CMI idénticos a  $T_{VSM}$  de exposiciones situadas por encima de la CPM y el efecto de ambas exposiciones es completamente diferente (figura 35 y 36).

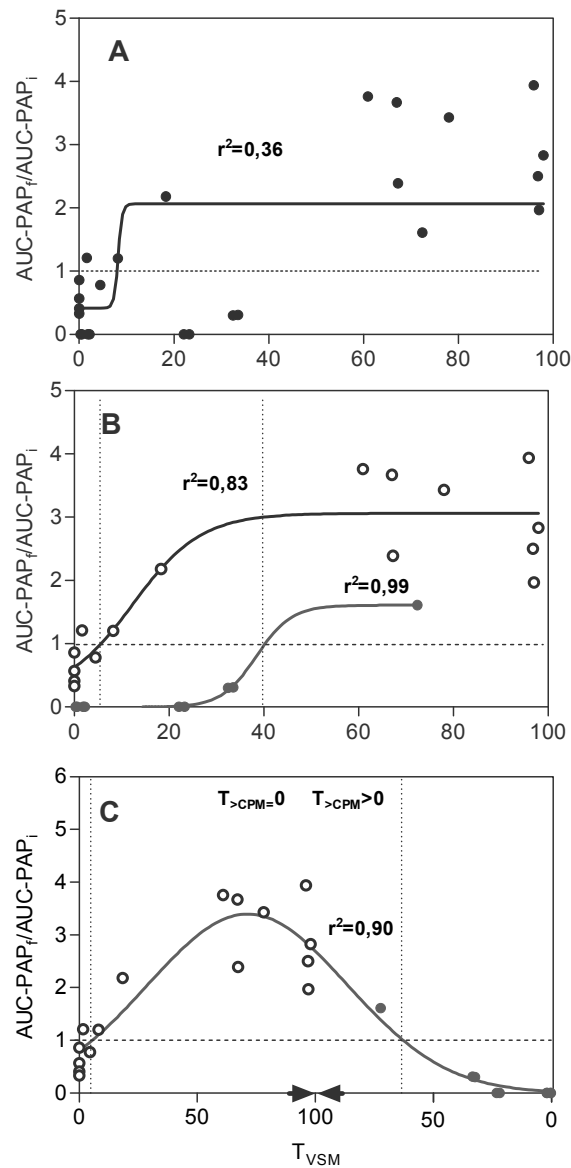


**Figura 37.** Relación (escala logarítmica) entre la exposición de moxifloxacino y la selección de resistencias en *S. maltophilia*.

AUC/CMI vs.  $N_F/N_i 2X$ :  $a=2,029$ ,  $x_c=1,546$ ,  $b=0,3356$ . vs.  $N_F/N_i 4X$ :  $a=3,258$ ,  $x_c=1,56$ ,  $b=0,2920$ . vs.  $N_F/N_i 8X$ :  $a=3,24$ ,  $x_c=1,604$ ,  $b=0,2770$ . AUC-PAP:  $a=3,612$ ,  $x_c=1,59$ ,  $b=0,2770$ .  $Y \leq 1$ ; no hay selección de resistencias. La intersección de la campana con  $Y=1$  define el intervalo de AUC/CMI donde es probable encontrar (dentro de la campana) o no (fuera de la campana) resistencias). La flecha indica el punto donde la resistencia se asocia con un pronunciado efecto antimicrobiano.



**Figura 38.** Relación (escala logarítmica) entre el AUC/CPM y la selección de resistencias en *S. maltophilia*.  $a=3,302$ ,  $x_c=0909$ ,  $b=0,3031$ .  $Y \leq 1$ ; no hay selección de resistencias



**Figura 39.** Relación entre el  $T_{VSM}$  (%) y el AUC-PAP. A. ajuste con la serie completa de datos, B.  $T_{VSM}$  vs.  $T_{>CMP}=0$  (○)  $T_{VSM}$ ;  $Y_{max}=3,1$ ,  $Y_{min}=0,2$   $x_0=12,4$ ,  $d_x=7,2$ ,  $T_{VSM}$  vs.  $T_{>CMP}>0$  (●)  $Y_{max}=1,6$ ,  $Y_{min}=0,0$   $x_0=38,4$   $d_x=3,7$ , C.  $a=3,4$ ,  $x_c=71,2$ ,  $b=42,12$

Tratando por separado las exposiciones donde es más probable encontrar resistencias, es decir exposiciones situadas por debajo de la CPM,  $T_{>CPM}=0$  y las exposiciones con menor probabilidad para seleccionar resistencias con un efecto microbiológico apropiado, es decir las exposiciones con un  $T_{>CPM}>0$  se consigue un ajuste robusto ( $r^2=0,83-0,99$ ), por separado, de la relación  $T_{VSM}$ -AUC-PAP (figura 39B). Estos modelos estiman que un  $T_{VSM}>5\%$  para la rama ascendente y un  $T_{VSM} >38\%$  para la rama descendente se asociarían con la selección de resistencias. Agrupando ambas series por separado con respecto al  $T_{VSM}$  (figura 39C) los datos pueden ajustarse empleando una ecuación tipo Gauss. Las estimaciones fueron idénticas indicando que un  $T_{VSM}$  de entre 5-63% se asocia con un aumento de la selección de resistencias en *S. maltophilia*.

#### **4.6.10 Probabilidad de alcanzar las dianas terapéuticas empleando la simulación de Monte Carlo**

Cada uno de los 10.000 AUCs (libres o totales) de la distribución generada a partir de los parámetros farmacocinéticos poblacionales de moxifloxacino de las dosis orales de 200 mg, 400 mg (primera dosis, después de múltiples dosis y de acuerdo a la disposición de concentraciones en LRE) y 800 mg fue dividido por un valor de CMI comprendido entre 0.015-8 µg/ml.

La frecuencia con la que se alcanzó o superó una exposición de moxifloxacino equivalente a un AUC/CMI de 68 horas ( $AUC/CMI_{80}$ ) o a un AUC/CMI de 108 horas (cociente asociado con la supresión de resistencias, MSR) se muestra en la figura 40. Como se recoge en esta figura, la dosis oral de 200 mg sería suficiente para alcanzar ambas dianas en pacientes infectados por cepas con una CMI  $\leq 0,12$  µg/ml. La probabilidad de alcanzar las dianas terapéuticas disminuye drásticamente en cepas de menor sensibilidad.

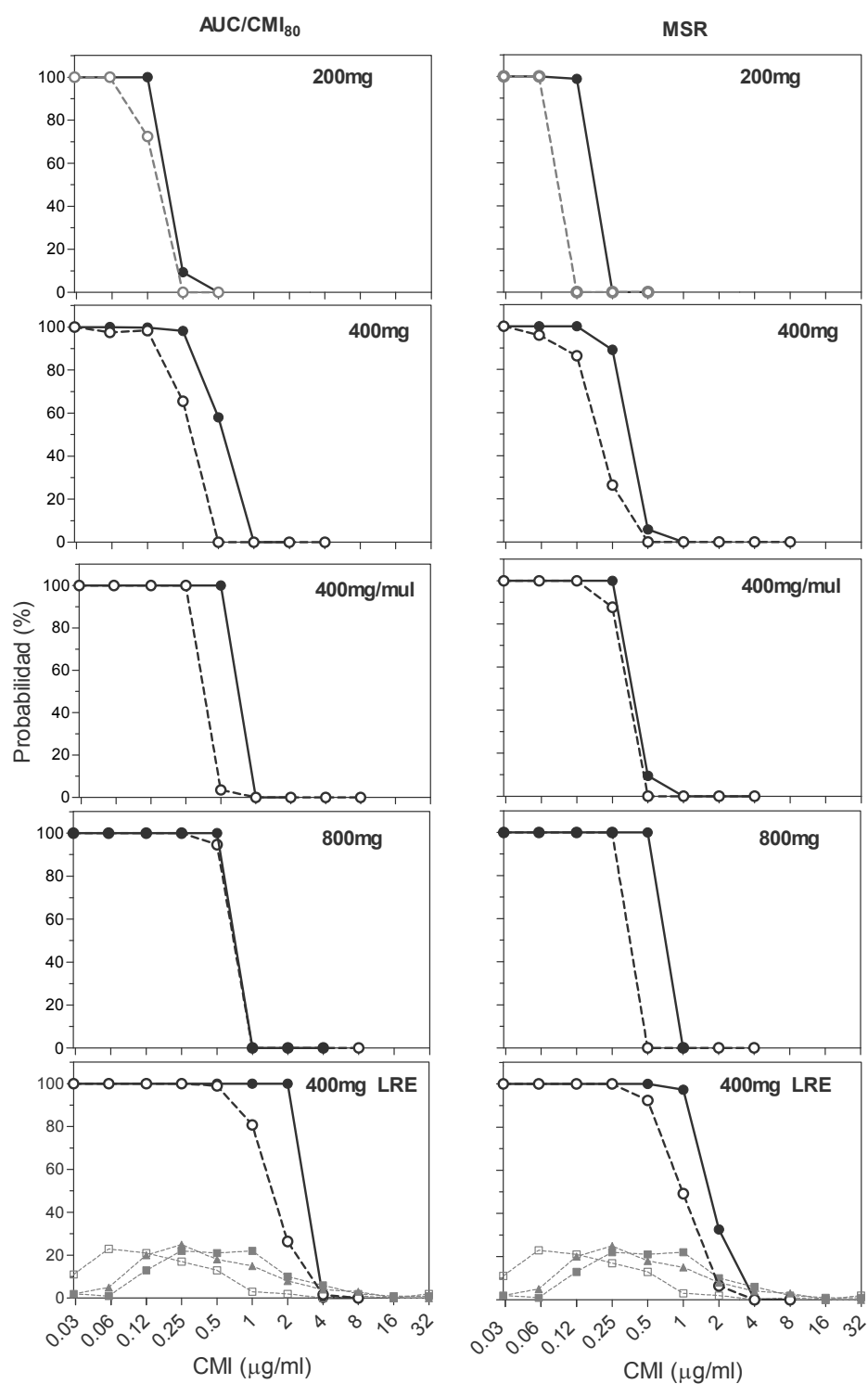
Con la dosis oral de 400 mg la probabilidad de alcanzar el  $AUC/CMI_{80}$  y la MSR aumenta hasta el 98% y el 89% en cepas con CMI=0,25 µg/ml y decrece hasta el 58% y 6% respectivamente en cepas de CMI =0,5 µg/ml. En el estado estacionario (múltiples dosis) la frecuencia mejora frente a cepas con CMI =0,25 µg/ml, 100% y 100% y frente a cepas de CMI =0,5 µg/ml, 100% y 8,6% para el  $AUC/CMI_{80}$  y la MSR respectivamente.

La dosis oral de 800 mg permitiría alcanzar ambas dianas en cepas con una CMI  $\leq 0,5$  µg/ml.

La probabilidad de alcanzar el  $AUC/CMI_{80}$  de acuerdo a la disposición de concentraciones en el LRE, sería  $\geq 99\%$  frente a cepas con una CMI  $\leq 2$  µg/ml. La probabilidad de alcanzar la MSR sería del 97% frente a cepas de CMI  $\leq 1$  µg/ml y del 32% frente a cepas de CMI =2 µg/ml. La frecuencia se reduce frente a las cepas de CMI =4 µg/ml ( $AUC/CMI_{80}$  8,5% y MSR 0,25%).

La probabilidad de alcanzar el  $AUC/CMI_{80}$  y la MSR desciende si solo se considera la fracción de concentraciones libre en plasma (figura 40). Dosis de 200 mg podrían alcanzar ambas dianas terapéuticas frente a cepas de CMI =0,25 µg/ml. Con la dosis de 400 mg (primera dosis) la probabilidad de alcanzar el  $AUC/CMI_{80}$  es  $>98\%$  frente a cepas de CMI =0,12 µg/ml y del 65% frente a cepas de CMI =0,25 µg/ml, mientras que la probabilidad de alcanzar la MSR sería del 86% y 26% respectivamente.

**Figura 40.** Probabilidad de alcanzar las dianas terapéuticas AUC/CMI<sub>80</sub> y MSR de acuerdo a la sensibilidad de *S. maltophilia* a moxifloxacino



En el estado estacionario, la probabilidad sería del 100% frente a cepas de CMI =0,25 µg/ml y del 100% y del 86% frente a cepas de CMI =0,25 µg/ml. La dosis de 800 mg presentarían una probabilidad  $\geq 94\%$  de alcanzar la diana AUC/CMI<sub>80</sub> frente a las cepas con una CMI  $\leq 0,5$  µg/ml, mientras que la probabilidad de alcanzar la MSR solos ería  $>90\%$  en cepas con una CMI  $\leq 0,25$  µg/ml. La disposición de concentraciones en el LRE permitiría alcanzar ambas dianas frente a cepas de CMI  $\leq 0,5$  µg/ml. En el caso del AUC/CMI<sub>80</sub> la probabilidad desciende hasta el 80%, 26% y 2% para cepas de CMI de 1, 2 y 4 µg/ml y en el de la MSR hasta el 49%, 6% y 0%.

Los puntos de corte FC/FD que pronosticarían la eficacia clínica de moxifloxacino en esta especie considerando una frecuencia crítica de casos  $\geq 90\%$  y en función de la dosis y distribución a compartimentos profundos, se exponen en la tabla 48.

**Tabla 48.** Puntos de corte FC/FD para moxifloxacino en *S. maltophilia*

Dosis /compartimento	AUC		fAUC	
	AUC/CMI <sub>80</sub>	MSR	AUC/CMI <sub>80</sub>	MSR
200 po.	0,12	0,12	0,06	0,06
400 po.	0,25	0,12	0,12	0,06
400 po. múltiples	0,5	0,25	0,25	0,12
800 po.	0,5	0,5	0,5	0,25
400 po./LRE	2	1	0,5	0,5

fAUC: AUC de la fracción de concentraciones libres

AUC/CMI<sub>80</sub>= 68 horas MSR, cociente AUC/CMI=108 horas po.; oral. iv.; intravenosa. LRE; líquido de revestimiento epitelial pulmonar

La proporción de pacientes que con una dosis particular podría alcanzar o superar las dianas AUC/CMI<sub>80</sub> y MSR, teniendo en cuenta la distribución de sensibilidad de *S. maltophilia* a moxifloxacino es decir la probabilidad de éxito empírico, se expone en las tablas 49 y 50.

Como se muestra en las tablas la proporción de pacientes que podría ser tratado con éxito con una dosis de 200 mg sería muy bajo pero aumentaría significativamente con el aumento de la exposición de moxifloxacino.

Aplicando la MSR como diana terapéutica, menos del 40% de los pacientes podría ser tratado con éxito con dosis de 400 mg. Este porcentaje aumentaría hasta el 58% con dosis de 800 mg y al 83% en pacientes con infecciones donde las concentraciones en LRE sean relevantes. De aplicar el AUC/CMI<sub>80</sub>, entre un 13-20% ( $p<0,01$ ) de pacientes adicionales sería candidato al tratamiento con dosis de 400 mg, y por lo tanto estarían en situación de riesgo de selección de subpoblaciones resistentes durante el tratamiento.

El porcentaje de pacientes que podría ser tratado con éxito no sería significativamente diferente empleando una u otra diana terapéutica cuando la exposición de moxifloxacino sea lo suficientemente amplia, y esto ocurriría con dosis 800 mg o de 400 mg si tenemos en cuenta la disposición de contracciones en LRE.

Estas estimaciones disminuirían sensiblemente ( $p<0,01$ ) al considerar la fracción libre de moxifloxacino.

Del mismo modo la distribución de sensibilidad de los aislados clínicos influye significativamente en la proporción de pacientes que podría alcanzar las dianas terapéuticas si recibiesen una



dosis particular de moxifloxacino ( $p<0,001$ ). Esta variación sería inferior entre colecciones de aislados multicéntricos (este trabajo vs. EUCAST), pero significativamente diferente al porcentaje de pacientes que alcanzarían las dianas terapéuticas en la serie de aislados obtenida por Valdezate y cols., procedentes de un solo hospital. En cualquier caso el porcentaje de éxito con dosis de 400 mg en infecciones que requieran niveles elevados en ELF oscilaría entre el 83-95%.

**Tabla 49.** Proporción de pacientes que alcanzarían o superarían la exposición de moxifloxacino necesaria para conseguir la completa supresión de resistencias (cociente AUC/CMI=108 horas) de acuerdo a la distribución de sensibilidad del microorganismo

Dosificación (mg)	Distribución de sensibilidad a moxifloxacino en <i>S. maltophilia</i>					
	este trabajo (n=106)		Valdezate y cols. (n=99)		EUCAST (n=695)	
	AUC	$\bar{A}UC$	AUC	$\bar{A}UC$	AUC	$\bar{A}UC$
200 po.	15,9	2,8	61,4	40,4	27,8	7,8
400 po.	36,6	19,9	77,7	62,3	51,1	31,6
400 po. múltiples	39,7	35,1	80,0	76,7	54,5	49,8
800 po.	58,5	37,7	91,9	78,8	70,8	52,8
400 po. (LRE)	83,0	68,3	95,5	92,5	87,7	79,2

$\bar{A}UC$ ; AUC de la fracción de concentraciones libres.

**Tabla 50.** Proporción de pacientes que alcanzarían o superarían la exposición de moxifloxacino necesaria para conseguir el 80% del efecto antibacteriano máximo (cociente AUC/CMI=68 horas) de acuerdo a la distribución de sensibilidad del microorganismo

Dosificación (mg)	Distribución de sensibilidad a moxifloxacino en <i>S. maltophilia</i>					
	este trabajo (n=106)		Valdezate y cols. (n=99)		EUCAST (n=695)	
	AUC	$\bar{A}UC$	AUC	$\bar{A}UC$	AUC	$\bar{A}UC$
200 po.	18,1	12,4	63,2	55,8	30,4	22,5
400 po.	49,4	30,0	86,0	71,9	62,7	43,8
400 po. múltiples	58,5	38,5	91,9	79,3	70,8	53,4
800 po.	58,5	57,4	91,9	91,2	70,8	69,8
400 po. (LRE)	91,0	78,6	95,5	94,8	93,6	84,6

$\bar{A}UC$ ; AUC de la fracción de concentraciones libres

## **5. DISCUSIÓN**

El manejo de las infecciones severas atribuidas a *Stenotrophomonas maltophilia* es un reto complejo de abordar. Esta complejidad la resumieron Hanes y cols expresando que, "*los pacientes no mueren como resultado de la infección por S. maltophilia sino, más bien, como resultado de la falta de terapia antibiótica empírica adecuada asociada a la infección de S. maltophilia*" (30). La carencia de antimicrobianos con suficiente actividad, la rápida aparición de resistencias en los pacientes bajo tratamiento y la ausencia de ensayos clínicos que discriminen la efectividad de los tratamientos que generan ciertas expectativas, son básicamente los elementos que conducen a esta dramática situación (8,15,30,34,118).

La incidencia de las infecciones severas por *S. maltophilia* está aumentando de forma análoga al incremento de las poblaciones de pacientes con factores predisponentes. La inmunosupresión, las terapias antineoplásicas agresivas, neutropenia, hospitalización, presión antibiótica, dispositivos de acceso venoso de larga duración y las intervenciones terapéuticas como la traqueotomía o la ventilación mecánica han sido identificados como factores de riesgo independientes para la infección por *S. maltophilia* (29,31,33,34,306). El tratamiento de las infecciones severas por *S. maltophilia* es mayoritariamente empírico y no sorprende que dada la falta de agentes con una actividad significativa frente al microorganismo la mayoría de los pacientes infectados con el microorganismo reciba una terapia no apropiada. Se estima que entre el 36 y el 67% de los pacientes que reciben terapias empíricas no apropiadas presentan un desenlace fatal (33, 31). La administración de terapias empíricas inapropiadas ha sido identificado en los estudios de casos controlados como un factor de riesgo independiente de la alta mortalidad en pacientes con aislados respiratorios (10,30) y bacteriemia (31,33,34). Curiosamente en las neumonías por este microorganismo la terapia empírica inapropiada se asocia con la mortalidad y la infección por *S. maltophilia* con el aumento de la morbilidad pero no de la mortalidad (30).

La probabilidad de supervivencia aumenta significativamente con la rápida administración de agentes para los que el microorganismo muestra sensibilidad *in vitro* (15,33,34). Cotrimoxazol es considerado tratamiento de choque en las infecciones por *S. maltophilia* por la actividad que ha venido demostrando *in vitro* en las últimas tres décadas (8,22,30,34,125, 152,161), pero no es pautado de forma empírica por su comportamiento bacteriostático y por la falta de actividad frente a otros microorganismos nosocomiales (30). La intolerancia y aumento de la resistencia a cotrimoxazol (55,103,104,116,312-315) y la limitada actividad de las alternativas terapéuticas, ticarcilina-ácido clavulánico o ceftazidima, reduce sustancialmente la cobertura de la terapia empírica y las expectativas del tratamiento dirigido con cultivo confirmado del microorganismo. La mortalidad en grupos de pacientes con factores de riesgo para la infección o en pacientes con cultivos confirmados varía entre el 14 y el 45%, indicando altas tasas de fracaso clínico de las terapias dirigidas (15,34,31).

### 5.1 Variabilidad genética de *S. maltophilia*

El origen de *S. maltophilia* en los pacientes infectados es desconocido aunque se sugiere como más probable que el paciente porte al microorganismo en el momento del ingreso y que la combinación de la presión antibiótica, especialmente aminoglucósidos y carbapenemas (34,31) con el profundo y prolongado estado de inmunosupresión favorezcan el desarrollo de la infección (33). *S. maltophilia* ha sido encontrado en diversas fuentes ambientales, incluyendo plantas, agua, suelo, sedimentos y se han sugerido que el tracto respiratorio y gastrointestinal serían reservorios del microorganismo (8,9,26). El resultado de esta adaptación es la amplia diversidad genética que presentan los aislados clínicos de *S. maltophilia* (62,68) incluso cuando proceden de un único hospital (286). Valdezate y cols, encontraron que unos 72% de los aislados obtenidos de un solo hospital presentaron un perfil de macrorestricción único. No obstante, aunque minoritarios algunos clones pueden ser transmitidos entre diferentes pacientes originando brotes y situaciones epidémicas (33,286). En estos casos, diferentes fuentes presentes en el hospital y equipos y desinfectantes han sido reconocidos por su contribución a la diseminación del microorganismo (8,286).

Los aislados clínicos de *S. maltophilia* estudiados en esta memoria procedieron de diferentes centros hospitalarios de nuestra geografía reduciendo la probabilidad de estudiar organismos relacionados genéticamente. Al mismo tiempo aumentó la sensibilidad de las observaciones al introducir situaciones clínicas más heterogéneas dado que las políticas restrictivas de uso de antimicrobianos influyen fuertemente en el patrón de sensibilidad de *S. maltophilia* (55,117). El tipado molecular mediante PFGE reveló una amplia diversidad de pulsotipos. Aunque se identificaron pequeñas agrupaciones de cepas relacionadas (15%), la mayoría fueron aislados únicos. Los clones identificados fueron aislamientos sucesivos en un mismo paciente, y por lo tanto parece lógico que en series multicéntricas la aplicación de criterios demográficos para la exclusión de aislados repetidos sería un criterio suficiente para asegurar una serie de estudio poco relacionada genéticamente (113). La discriminación molecular sería más recomendable para series que incorporan aislamientos procedentes de un único hospital (135). No obstante hay que reconocer que aun así es posible la introducción de aislados repetidos en las series multicéntricas procedentes de transmisiones cruzadas entre pacientes.

### 5.2 Sensibilidad a los antimicrobianos

Los resultados de esta memoria coinciden con los descritos en otras largas series de aislados clínicos donde se demuestra que solo cotrimoxazol, ticarcilina-ácido clavulánico, las fluorquinolonas, y algunas tetraciclinas presentan suficiente actividad frente al microorganismo (107,109,110,112-115,124,135) y confirman que se trata de una especie de escasa variabilidad en el fenotipo de resistencia a pesar de la elevada diversidad genética.

El porcentaje de cepas resistentes a cotrimoxazol y ticarcilina-ácido clavulánico obtenido en este trabajo es preocupantemente alto, un 30%, dadas las implicaciones de ambos antimicrobianos en la terapéutica del microorganismo. Aunque una mayoría de estudios muestra que entre el

90-100% de las cepas son sensibles a cotrimoxazol (124,125,146,307-309), en algunos estudios procedentes de diversas áreas geográficas, incluida España, se describen tasas de resistencia de entre el 16-79% (32,103,104,107,116,135,310-315). En España han sido descritos porcentajes de resistencias muy similares a las obtenidas en esta memoria para cotrimoxazol tanto en series procedentes de estudios multicéntricos (107) como de series procedentes de hospitales (107,135,316) pero también series de aislados altamente sensibles (>98%) (117,317) donde se manifiestan políticas restrictivas de uso de cotrimoxazol (117). La resistencia está siendo descrita más frecuentemente, especialmente en los últimos años (103,104,116,312-315), desde la caracterización de cepas elementos móviles integrones tipo 1 y elementos de inserción ISCR asociados con los genes *sul* y *dfra* en cepas resistentes a cotrimoxazol (101-103). Cepas portadoras de estos elementos móviles han sido detectadas en todo el mundo sugiriendo la rápida diseminación de estos determinantes de resistencia en *S. maltophilia*. La diseminación está fuertemente favorecida por la presión selectiva de cotrimoxazol (318) y también posiblemente de los compuestos de amonio cuaternario incorporados al ámbito hospitalario dado que muchas cepas resistentes a cotrimoxazol portan genes de resistencia a estos compuestos en integrones tipo 1 (103).

Curiosamente nuestra serie incluye un porcentaje de aislados clínicos procedentes de muestras urinarias (28%) muy superior a los estudiados en otros trabajos, donde el tracto respiratorio y los aislamientos de sangre son los más frecuentes (22,29,125,135,319). La prevalencia de aislados resistentes a cotrimoxazol, pero no a moxifloxacino, levofloxacino o ticarcilina-ácido clavulánico fue significativamente superior en este tipo de muestras. Probablemente los eventos de transferencia genética y de adquisición de determinantes de resistencia a cotrimoxazol sean más frecuentes entre patógenos urinarios (318).

Las pruebas de sensibilidad son el único argumento sólido que apoya que cotrimoxazol sea el agente predilecto de las infecciones por *S. maltophilia* (8). La experiencia clínica ha sido poco documentada (15,22,29,55,171). En series de casos retrospectivos o prospectivos de bacteriemias se ha asociado con una mortalidad cruda en torno al 21-31%, comparativamente inferior a la de las cefalosporinas de tercera generación o betalactámicos de espectro ampliado, similar a la de quinolonas como norfloxacino y ciprofloxacino (140,143) o levofloxacino (143) o tigeciclina (320). De esta forma el aumento de la resistencia *in vitro* y la posibilidad de desarrollo de resistencias bajo tratamiento en las cepas sensibles (104, 143) supone un serio revés para el tratamiento futuro de las infecciones por este microorganismo.

Recientemente el EUCAST ha recomendado que se deberían considerar resistentes a aminoglucósidos, polimixina B o colistina en todos los aislados clínicos de *S. maltophilia* al margen de la sensibilidad que muestren *in vitro*. Esta medida parece acertada dado que la expresión constitutiva del gen AAC-6`Iz y de los sistemas de expulsión SmeABC y SmeYZ en la mayoría de los aislados clínicos (66,67,82) confiere en este y otros trabajos resistencias a los aminoglucósidos en más del 80% de los aislados (107,135). Esta recomendación se extiende también a los carbapenemas dada la fácil y rápida selección de mutantes estables (130). La

producción de la metaloenzima L1 confiere resistencia natural a los carbapenemas y es la consecuencia principal del aumento de la prevalencia de esta especie en el medio hospitalario (9,29). Junto a la L1, la expresión de la betalactamasa L2 proporciona resistencia intrínseca frente a los betalactámicos en esta especie (8,107,122,133,135) por lo que no es extraño que menos del 23% de nuestras cepas, en la misma línea que otros trabajos, fueron sensibles a ceftazidima, cefepima, ticarcilina, aztreonam o piperacilina (107,135). En cambio en combinación con ácido clavulánico la resistencia a ticarcilina, cefepima y aztreonam se redujo significativamente (34%, 20% y 40%, respectivamente). En combinación con otros inhibidores de betalactamasas, tazobactam o sulbactam, la actividad parece muy inferior (123,133) y esto es debido que el ácido clavulánico inhibe irreversiblemente a la enzima L2 más eficazmente (123,321) y es más estable frente a la metaloenzima L1 (321,322). No obstante, hay que destacar que menos del 50% de las cepas fueron sensibles a ticarcilina-ácido clavulánico que es recomendado por consenso como tratamiento alternativo en casos de intolerancia o resistencia a cotrimoxazol (8, 172). El progresivo aumento de la prevalencia de cepas no sensibles a esta combinación (55, 135, 319,323) es motivo de preocupación debido a que las cepas con una resistencia intermedia y las cepas resistentes responden de manera similar a dosis terapéuticas (118). La selección de subpoblaciones con betalactamasas más estables podría explicar este comportamiento y posiblemente la asociación entre el uso hospitalario de amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, ticarcilina o piperacilina/tazobactam y el aumento de la resistencia a ticarcilina/ácido clavulánico (323).

Los resultados de sensibilidad de este estudio muestran que cefepima o aztreonam en combinación con ácido clavulánico serían alternativas más razonables que ticarcilina-ácido clavulánico. A diferencia de cefepima-ácido clavulánico, la actividad de la combinación aztreonam-ácido clavulánico ha sido ampliamente estudiada en esta especie (133,135,161,316) y ha demostrado ser extremadamente dependiente de las concentraciones del inhibidor. En proporción 1:1 o 2:1 la potencia es excepcional pero las diferencias farmacocinéticas entre el aztreonam y el ácido clavulánico imposibilitarían mantener clínicamente las concentraciones sugeridas en la combinación (133). En combinación con 2 µg/ml de inhibidor la actividad descende significativamente (133,135,161,316). La actividad de esta combinación y la dependencia del inhibidor, es debida a que aztreonam solo es sustrato de la cefalosporinasa L2 (87,322), pero a la vez es potente inductor de la enzima L2 (324) y esto aumenta la dependencia de las concentraciones de inhibidor para mantener el sinergismo. Se ha demostrado que la inducción de los genes L1 y L2 en *S. maltophilia* se regula de forma autónoma y es dependiente del sustrato, ya sea betalactámico o el propio inhibidor de betalactamasas y de la concentración de inductor (88,324). Por este motivo es factible que la actividad superior de ticarcilina y cefepima con 2 µg/ml de inhibidor sea debida a que son sustratos poco inductores de la L2 y esto en parte se demuestra con el hecho de que la actividad de ambas combinaciones es similar al aumentar la concentración del inhibidor (121,123). Al margen de la capacidad para inducir a la L2, la actividad de cefepima y ticarcilina

en combinación con el ácido clavulánico radicaría en la eficiencia catalítica de la enzima L1, que sería 200 veces menor en cefepima (322,325). De hecho se asume que el impacto de la enzima L1 en la resistencia a cefepima sería insignificante ya que mutantes deficientes en L2 son hipersensibles a cefepima (324). Esta diferente acción de las enzimas L1 y L2 es probablemente responsable de la actividad significativamente superior de cefepima/ácido clavulánico a dosis de 3 g/125 mg en comparación con la de ticarcilina/ácido clavulánico a dosis de 3 g/100 mg observada en un sistema farmacodinámico *in vitro*. Cefepima/ácido clavulánico consiguió reducir en más del 99% la carga bacteriana de las cepas con resistencia intermedia a la combinación, sin aparente selección de resistencias (326).

La actividad de tigeciclina, minociclina y doxiciclina fue excelente con una sensibilidad superior al 90%, consistente con algunos estudios que invariablemente muestran prácticamente la misma actividad (317,327-330). Sin embargo la prolongación del tiempo de incubación hasta las 48 horas reduce significativamente la sensibilidad para minociclina y doxiciclina pero no para tigeciclina aunque no se encontraron cepas resistentes. El significado clínico de esta acumulación de aislados en la categoría de sensibilidad intermedia es desconocido.

En este estudio no encontramos diferencias significativas entre minociclina y doxiciclina, pero la primera se supone del orden de dos veces más potente (135,328). No obstante la experiencia clínica en ambos casos es anecdótica (55,331).

Tigeciclina mostró una potencia superior inhibiendo al 91% de los aislados a concentraciones inferiores a los 2 µg/ml propuestos por la FDA como punto de corte provisional para las cepas sensibles (117,146,317) y a más del 75% de los aislados no sensibles a doxiciclina, minociclina y resistentes a cotrimoxazol. Un reciente estudio demuestra que el 50% y 90% de los aislados resistentes a cotrimoxazol se inhiben con concentraciones de 1 y 4 µg/ml, respectivamente (331). Sin embargo la extensa distribución de tigeciclina tras la administración intravenosa reduce significativamente las concentraciones de tigeciclina en plasma por debajo de estos niveles. Se estima que solo sería eficaz frente a cepas con CMI ≤ 0,25 µg/ml (332), es decir, frente a un 19-30% de los aislados incluidos en esta serie. Dosis altas de tigeciclina han demostrado ser efectivas en las bacteriemias (333), pero pueden asociarse a efectos adversos significativos (334). La efectividad en infecciones nosocomiales por *S. maltophilia* es similar a cotrimoxazol (320).

Los resultados de sensibilidad a quinolonas obtenidos en esta memoria no difieren esencialmente de los encontrados en trabajos previos (109,112,113,117,134,135). Menos del 20% de las cepas fueron sensibles a ciprofloxacino y norfloxacino. Ambas quinolonas han sido ampliamente utilizadas para tratar las infecciones de *S. maltophilia* (152) pero el sobreuso a nivel mundial ha originado un aumento de la resistencia (117,335). Levofloxacino se encontraría en una situación similar (336). De hecho en este trabajo encontramos una sensibilidad inferior al 77%, que contrasta con el 90-96% observado por otros unos años antes (113,135).

Las nuevas fluorquinolonas fueron significativamente más activas que ciprofloxacino, especialmente clinafloxacino y moxifloxacino con sensibilidades próximas al 90%. La actividad

de las fluorquinolonas se mantiene en cepas resistentes a ticarcilina-ácido clavulánico y ceftazidima y aunque aumenta ligeramente entre los aislados resistentes a cotrimoxazol, este no es significativo ( $p < 0,05$ ), por lo que podrían ser alternativas prometedoras a cotrimoxazol en las infecciones por *S. maltophilia*. Este papel podría ser más relevante en las neumonías por el microorganismo debido a la extensa distribución a tejidos de algunas quinolonas como gatifloxacino y moxifloxacino (304,337-339).

La experiencia clínica, limitada a levofloxacino, revela en dos estudios retrospectivos en bacteriemias una respuesta microbiológica (62%) y mortalidad a 30 días (27%) similares a cotrimoxazol (65% y 20% respectivamente) (340,341), aunque con un significativo menor número de efectos adversos (340).

En ausencia de ensayos clínicos controlados, el estudio de la sensibilidad y la reducida experiencia clínica procedente de casos clínicos o series de casos retrospectivos y prospectivos, son la única evidencia razonable, en esta especie, para la selección de antimicrobianos apropiados en el tratamiento de las infecciones causadas por el microorganismo (8,118,152). Esta evidencia es insuficiente tal y como reflejan el CLSI o el EUCAST al considerar a tan solo seis antimicrobianos, ceftazidima, minociclina, levofloxacino y cloranfenicol y los dos tratamientos de elección, cotrimoxazol y ticarcilina-ácido clavulánico, como tratamientos apropiados frente al microorganismo y confía en la CMI el criterio pronóstico de la eficacia clínica del tratamiento antimicrobiano en *S. maltophilia*. Llegados a este punto solo queda formularse una pregunta, ¿es adecuado el criterio exclusivo de la CMI como pronóstico de la eficacia clínica en esta especie?.

Resumiendo, los datos de sensibilidad obtenidos en este trabajo muestran una pérdida de sensibilidad extremadamente preocupante a los tratamientos de elección, cotrimoxazol o ticarcilina clavulánico. De acuerdo al "pronóstico" de eficacia de la CMI, fluorquinolonas como moxifloxacino o gatifloxacino o levofloxacino y las tetraciclinas doxiciclina o tigeciclina o minociclina o la combinación cefepima-ácido clavulánico podrían ser, de acuerdo a este estudio de sensibilidad, serias alternativas, entre los agentes disponibles para la práctica clínica, de tratamiento de las infecciones por *S. maltophilia*. Aunque es un tema muy controvertido y puede no asociarse a un mejor pronóstico clínico, la superioridad que muestran los antimicrobianos bactericidas frente a los bacteriostáticos en algunas infecciones como las bacteriemias, endocarditis, meningitis, osteomielitis y especialmente en las infecciones de pacientes inmunocomprometidos (173) convierte a las fluorquinolonas en agentes alternativos de preferencia para las infecciones por *S. maltophilia*. La combinación cefepima-ácido clavulánico necesitaría ser examinada más profundamente para poder extraer las mismas conclusiones.



### 5.3 Factores modificadores de la sensibilidad a los antimicrobianos

La importancia de excluir a los aislados clínicos repetidos en los estudios de sensibilidad estriba en que estos aislados contribuyen al aumento de la sensibilidad o de la resistencia de las series estudiadas (135). En esta memoria, con ambos métodos de discriminación, molecular y demográfica, la resistencia a quinolonas, rifampicina o cotrimoxazol se redujo en un 4% y la de betalactámicos y combinaciones aumentó en un 6%. Estos cambios estuvieron relacionados con aumentos de la resistencia en el sentido opuesto en el grupo de aislamientos repetidos donde la prevalencia de cepas resistentes fue significativamente superior para norfloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, gentamicina, rifampicina, o cotrimoxazol. Todos los aislamientos pertenecientes al mismo clon presentaron niveles de sensibilidad muy similares, deduciendo que probablemente un clon específico persistió en el paciente o entre pacientes porque disponía de los determinantes de resistencia de la presión selectiva ejercida en ese o esos pacientes. Que el número de cepas resistentes se incrementara proporcionalmente más en el grupo de aislados con un PFGE único con la extensión de la incubación de la prueba de sensibilidad hasta las 48 horas demostró que estos determinantes existieron también en las cepas únicas (no repetidas) y que a diferencia del grupo de cepas con un PFGE repetido, los aislados potencialmente resistentes con un PFGE único sólo se desenmascararán en las pruebas de sensibilidad con el aumento de la duración del ensayo.

La interpretación de los test de sensibilidad en esta especie es problemática debido a la falta de correlación de los resultados de sensibilidad obtenidos con la difusión en disco, microdilución en caldo, E-test, dilución en agar y diferentes sistemas automatizados de sensibilidad o al prolongar los tiempos de incubación de las pruebas (25,126,128). Ante la disparidad de resultados de sensibilidad obtenidos con diferentes métodos (25,126,128,131,160) y la falta de posicionamiento del CLSI al respecto, que recomienda indistintamente la difusión en agar, la dilución en agar o la microdilución en caldo como métodos de referencia y la interpretación de los resultados tras un periodo de incubación de 20-24 horas (232), en este trabajo empleamos como método de referencia la dilución en agar y la interpretación de la sensibilidad tras 24 horas y 48 horas de incubación.

La disminución de la sensibilidad en prácticamente todos los antimicrobianos con la prolongación del tiempo de incubación del ensayo, exceptuando moxifloxacin, gatifloxacin, clinafloxacin o tigeciclina (ver tablas 8, 9 y 11), demuestra que posiblemente los determinantes de resistencia responsables del fenómeno sean comunes a todas las clases de antimicrobianos. Esta vinculación entre los determinantes de resistencia y el tiempo de incubación se explicaría razonadamente al observar en esta memoria que las poblaciones de *S. maltophilia* no son uniformes en la sensibilidad a los antimicrobianos. Como hemos mostrado es relativamente habitual detectar en los aislados clínicos subpoblaciones de células inhibidas a concentraciones por encima de la CMI de moxifloxacin, y es altamente probable que esto ocurra también con el resto de antimicrobianos. Es obvio que estas subpoblaciones más

resistentes requerirán un tiempo mayor para detectarlas visualmente en las pruebas de sensibilidad (342), dependiente del tamaño relativo de la subpoblación dentro de la población específica.

La secuenciación del genoma completo de *S. maltophilia* ha revelado que este microorganismo codifica hasta ocho sistemas putativos de expulsión de la familia RND, SmeABC, SmeDEF, SmeGH, SmeIJK, SmeMN, SmeOPTolC, SmeVWX y SmeYZ (73), implicados en la resistencia intrínseca y adquirida del microorganismo (65-67,73-76,82,84.). Quinolonas, tetraciclinas, aminoglucósidos, macrólidos, cloranfenicol o cotrimoxazol son sustratos conocidos de estas bombas con un efecto en la resistencia final variable (65-67,76.). Es probable que la sobreexpresión de estos sistemas en las subpoblaciones resistentes sea responsable del fenómeno. En el caso de los betalactámicos el sistema SmeOPTolCsm contribuye ligeramente a incrementar la resistencia (84) y la sobreexpresión de SmeABC se asocia con la sobrerregulación de la enzima L2 (66,67). No obstante en los betalactámicos con un efecto tiempo-dependiente, y análogamente al efecto inóculo (343), la extensión de la incubación favorecería la hidrólisis del anillo betalactámico simplemente con los niveles basales de betalactamasa y en consecuencia el sobrecrecimiento de las subpoblaciones sean resistentes o no.

En consistencia con previas recomendaciones (128), la sensibilidad con la dilución en agar debería interpretarse tras 48 de incubación para los agentes bactericidas, a excepción de los betalactámicos, pero sería también prudente esta interpretación para agentes bacteriostáticos como tetraciclinas y cotrimoxazol, por las implicaciones clínicas que podrían asociarse siguiendo las propuestas del CLSI (232). Esta recomendación en los agentes bacteriostáticos se apoyaría en las diferencias encontradas con las tres tetraciclinas al prolongar la incubación y la contribución en la resistencia intrínseca y adquirida de los sistemas de expulsión en estas clases de antimicrobianos (65-67). La traducción clínica de las discrepancias en la sensibilidad al prolongar la incubación para los betalactámicos sería más dudosa (122,126).

De esta forma hay que extremar la prudencia al interpretar los resultados de sensibilidad de diferentes series (intrahospitalarias o interhospitalarias) teniendo en cuenta las posibles diferencias en las metodologías utilizadas.

#### **5.4 Factores metodológicos que modifican la sensibilidad a las quinolonas**

Comparado con la dilución en agar, el método de la microdilución en caldo requiere mayor tiempo de incubación para detectar la resistencia a quinolonas y la exagera significativamente cuando se prolonga por encima de las 24 horas propuestas por el CLSI. Los fenómenos de arrastre son muy comunes al prolongar las incubaciones con este método (126,128) y podrían explicar el fuerte aumento de la resistencia al extender la incubación. Según nuestros datos, la correlación entre las diferentes lecturas de la sensibilidad para la microdilución en caldo así como la correlación entre los resultados obtenidos con ambos métodos, microdilución en caldo y la dilución en agar, sería muy pobre. En lo que respecta a la terapéutica del microorganismo

la correlación entre métodos es un aspecto secundario frente a la prioridad de establecer una óptima relación entre el resultado clínico y el pronóstico de los diferentes métodos de sensibilidad.

A este respecto, se ha descrito ampliamente que la aproximación FC/FD de los estudios preclínicos pronostica la respuesta clínica en los pacientes bajo tratamiento (192,194,206,222,223,270). Dado que la relación FC/FD es altamente dependiente de la CMI del microorganismo (207), el pronóstico derivado de la elección de la CMI en esta especie, que como hemos visto es dependiente del método de sensibilidad y de la prolongación del tiempo de lectura, puede modificar el pronóstico de eficacia de la relación farmacocinética-farmacodinámica. Aprovechando la estrecha interrelación entre la farmacocinética, la CMI y la farmacodinámica es posible, no obstante, determinar el método de sensibilidad que permite establecer la relación más óptima entre la exposición (datos farmacocinéticos) y la respuesta (datos farmacodinámicos) del antimicrobiano. En esta memoria la exposición se relacionó con el efecto antibacteriano obtenido para tres fluorquinolonas con el sistema de microfiltración del orden de al menos 20-170 veces (según la quinolona) más correctamente empleando la dilución en agar tras una incubación de 48 horas que empleando cualquier otro método, microdilución en caldo o incluso E-test o cualquier otra extensión de la incubación de estas pruebas. Esto indica que la dilución en agar con la prolongación de la incubación hasta las 48 horas pronosticaría más robustamente el resultado clínico obtenido con las fluorquinolonas.

Las actuales recomendaciones del CLSI deberían contemplar este aspecto dado el peso específico de los estudios de sensibilidad en la selección de tratamientos efectivos y del papel fundamental de la CMI en el pronóstico de eficacia de la relación farmacocinética-farmacodinámica de los antimicrobianos. En consecuencia nuestros datos sugieren que el método de la dilución en agar con una incubación prolongada hasta las 48 horas debería ser considerado el método de referencia en el estudio de la sensibilidad a quinolonas en esta especie.

De acuerdo a estas variaciones en la sensibilidad, método dependientes, para las quinolonas se recomienda mostrar un extremado escepticismo con el pronóstico de eficacia procedente de los resultados de sensibilidad, especialmente si han sido obtenidos por métodos diferentes a la dilución en agar y que no contemplan una interpretación prolongada de las lecturas de incubación.

### **5.5 Relación FC/FD en las fluorquinolonas. Factores modificadores**

Las agencias reguladoras del medicamento, FDA y EMEA sugieren la inclusión de las relaciones FC/FD en los estudios preclínicos como vía para agilizar las diferentes fases de desarrollo de los nuevos antimicrobianos (225,226) y usar racionalmente los antimicrobianos disponibles en la farmacoterapia (225,226,192,200,206,222). La relación FC/FD identifica a los índices FC/FD que dirigen la respuesta clínica del antimicrobiano y su relación con la respuesta bacteriológica. Las magnitudes de eficacia resultantes se emplean para proponer los esquemas de dosificación más

apropiados de acuerdo a la probabilidad de alcanzar las magnitudes de eficacia en los pacientes infectados y los puntos de corte microbiológicos. Este mismo esquema se sugiere en la optimización de dosis y nuevas indicaciones terapéuticas para los antimicrobianos ya disponibles.

Las relaciones FC/FD son de especial relevancia cuando estos antimicrobianos se dirigen al tratamiento de microorganismos donde las expectativas de desarrollo de ensayos clínicos es muy reducida (206,222). La relación FC/FD en los estudios preclínicos se aborda a través de la experimentación animal y los sistemas FC/FD *in vitro*. No obstante en especies como *S. maltophilia* que muestran una dificultad manifiesta para conseguir parámetros reproducibles con la experimentación animal (8,285) la relación FC/FD originada con los sistemas FC/FD *in vitro* se convierte en el mejor enfoque basado en la evidencia para establecer el tratamiento de las infecciones por *S. maltophilia*.

En esta memoria han sido empleados dos sistemas farmacodinámicos *in vitro* que aunque son conceptualmente diferentes, facilitan por igual el estudio de la relación entre la farmacocinética y la farmacodinamia. Los aspectos estructurales han sido detalladamente revisados en la introducción y material y métodos de esta memoria. La imitación de los parámetros farmacocinéticos humanos aporta un conocimiento más realista de la interacción clínica antimicrobiano-bacteria (245,248) y esto se consigue en los sistemas dilucionales. De esta forma las estimaciones de eficacia que pudieran derivarse del sistema de microfiltración, fundamentado en el intercambio de concentraciones periódicas frente a la reproducción de parámetros farmacocinéticos, deberían ser tratadas cuidadosamente si se trasladan a la clínica humana. El poder predictivo de este modelo es meramente comparativo para los tratamientos reproducidos simultáneamente en esta memoria.

Con este sistema de microfiltración sólo simulamos una dosis de cada quinolona y con este diseño experimental la evaluación FC/FD no es posible (209,214). Los cambios en la CMI, cociente AUC/CMI o  $T_{>CMI}$  para cada fluorquinolona estuvieron estrechamente relacionados entre sí y mostraron un fuerte impacto en las medidas del efecto antibacteriano. Empleando un modelo inhibitorio de dosis-respuesta estos cambios se relacionaron adecuadamente con el AUC/CMI pero no con el  $T_{>CMI}$ , indicando que la actividad de las quinolonas varía significativamente con la dosis expuesta sobre el microorganismo. El cociente AUC/CMI ha sido validado y ampliamente usado como factor predictivo del efecto antibacteriano de las quinolonas en sistemas farmacodinámicos *in vitro* (178,189,196,209,214,215). La relación del AUC/CMI con la respuesta clínica y bacteriológica ha sido documentada en humanos con quinolonas como ciprofloxacino o grepafloxacino (223,270).

A diferencia de los estudios en humanos, la relación FC/FD *in vitro* está sujeta a una medida artificial de la respuesta del efecto para lo que se emplean múltiples aproximaciones, basadas en el recuento de bacterias, en el tiempo para alcanzar un efecto o en ambas. Como hemos visto en esta memoria la selección de la medida de efecto antibacteriano modifica el pronóstico

de eficacia y puede ser responsable de la variabilidad de las estimaciones generadas en diferentes trabajos (196,209,269).

En general, las medidas de efecto antibacteriano más reproducibles, menos variables entre repeticiones y más regulares y sensibles a los cambios del índice farmacodinámico, muestran una correlación más fuerte con el índice farmacodinámico dominante, es decir aumentan la capacidad pronóstico del análisis (196,209,269). En esta memoria las medidas del efecto, AUBKC y r24h ofrecieron una correlación más robusta con el AUC/CMI, aunque esta última mostró menor reproducibilidad y consecuentemente puntos más dispersos alrededor de la línea de tendencia del ajuste dosis respuesta. Esta dispersión es responsable de la amplia desviación estándar que mostraron las magnitudes asociadas con la eficacia de amoxicilina-ácido clavulánico en comparación con el AUBKC frente a *H. influenzae* o *S. pneumoniae* (344). Se sugiere que la correlación de cualquier medida del efecto basada en áreas es superior a la cualquier medida dependiente exclusivamente del tiempo o del recuento de microorganismos (269). De esta forma el AUBKC parece ser una medida apropiada para valorar el efecto antibacteriano.

## 5.6 Farmacodinámica comparativa de las fluorquinolonas

Este trabajo es el primer documento que compara la eficacia microbiológica de las fluorquinolonas más activas frente a *S. maltophilia* disponibles para la práctica clínica. Según nuestros datos dosis de 400 mg de moxifloxacino serían más activas que dosis de 500 mg de levofloxacino o de 400 mg de gatifloxacino. A juzgar por la actividad antibacteriana moxifloxacino podría ser activo frente a cepas con una CMI a ciprofloxacino  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$ , o una CMI a moxifloxacino de  $\leq 0,5$   $\mu\text{g/ml}$  (r24h  $\geq 2$ -log UFC/ml), mientras que levofloxacino o gatifloxacino mostrarían efectos comparables, solo, frente a cepas con una CMI a ciprofloxacino  $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$  (r24h  $\geq 2$ -log UFC/ml), o cepas con una CMI  $\leq 0,5$   $\mu\text{g/ml}$  a levofloxacino o gatifloxacino. En los tres casos la actividad es significativamente inferior en cepas de menor sensibilidad por lo que claramente los puntos de corte establecidos por el CLSI para levofloxacino en *S. maltophilia* deberían ser reconsiderados (232). Levofloxacino es la única quinolona que dispone de puntos de corte de sensibilidad microbiológica específicos para esta especie a pesar de que ciprofloxacino ha sido y es empleado intensamente en la clínica del microorganismo (8,152). Los puntos de corte para ciprofloxacino se extrapolan desde otras especies relacionadas, no enterobacterias, y estos sugieren como sensibles a cepas con una CMI  $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$ . Indirectamente nuestros datos también indicarían una rebaja exhaustiva de este pronóstico para ciprofloxacino dado que levofloxacino, moxifloxacino o gatifloxacino son del orden de 2 a 8 veces más potentes. Esta hipótesis es concordante con el efecto estático que ciprofloxacino mostró recientemente *in vitro* frente a *S. maltophilia* de CMI =  $0,5$   $\mu\text{g/ml}$  a dosis de 750 mg/12 horas (138) o con los resultados dispares encontrados en la práctica clínica con este antimicrobiano (55,109,168).

Desde un punto de vista farmacodinámico, exposiciones con cocientes AUC/CMI muy similares para las tres quinolonas originaron un efecto antibacteriano muy parecido, y posiblemente las magnitudes que se relacionan con la eficacia clínica en los tres casos no deberían ser significativamente diferentes. Dosis convencionales de moxifloxacino exhiben en cambio un perfil farmacocinético-farmacodinámico superior a levofloxacino o gatifloxacino en relación con la distribución de sensibilidad de *S. maltophilia*. De esta forma el tratamiento con moxifloxacino podría dar cobertura a un número de cepas sustancialmente superior.

No obstante la exposición a las tres fluorquinolonas estuvo relacionada con la selección de mutantes altamente resistentes especialmente en las cepas con una CMI a ciprofloxacino de  $\geq 1$   $\mu\text{g/ml}$  por lo que las estimaciones anteriores serían incluso demasiado favorables. La aparición de resistencias a las fluorquinolonas ha sido ampliamente documentada en estudios *in vitro* estáticos o dinámicos (118,126,139-141) y en pacientes bajo tratamiento (152,171,340).

De acuerdo a nuestros datos los mutantes resistentes se detectaron en cepas con una CMI a levofloxacino y moxifloxacino de  $>0,12$   $\mu\text{g/ml}$  e incluso en cepas de CMI=0,12  $\mu\text{g/ml}$  tras la exposición a gatifloxacino, por lo que cualquier pronóstico de eficacia basado en datos de actividad para las cepas de CMI de 0,25-0,5  $\mu\text{g/ml}$  (o incluso 0,12  $\mu\text{g/ml}$  para gatifloxacino) podría conducir a un fracaso del tratamiento. Es importante destacar que las resistencias cuantificadas con el modelo *in vitro* de microfiltración no deben ser consideradas como resistencias absolutas debido a que en este apartado no se valoró la estructura de la población inicial y por lo tanto no se conocieron los tamaños iniciales de las subpoblaciones en las cepas clínicas. Independientemente de esto, moxifloxacino previno de la aparición de resistencias en un número más elevado de cepas clínicas y por este motivo, en los sucesivos análisis realizados sólo se consideró a esta fluorquinolona, por parecer la opción terapéutica más recomendable.

Curiosamente la frecuencia de aparición de mutantes resistentes fue inferior o no existió en las cepas con sensibilidades extremas (CMI altas y CMI bajas) a ciprofloxacino, o a las fluorquinolonas (ver figura 26 y tablas 34-36). Las cepas con una sensibilidad intermedia (entre las CMI altas y bajas) que mostraron además un efecto antibacteriano muy variable, desarrollaron mutantes resistentes más intensamente en comparación. Por este mismo motivo cuando comparamos el ajuste entre el efecto antibacteriano y el AUC/CMI calculado con la CMI de 24h o 48h se observa una mayor dispersión de datos alrededor de las líneas de tendencia en las exposiciones centrales, que son las exposiciones características de las cepas con una sensibilidad intermedia. De esta forma, la variación de la sensibilidad al prolongar la incubación en las pruebas de sensibilidad orienta sobre la probabilidad de aparición de resistencias durante el tratamiento.

Según los datos obtenidos con el sistema de microfiltración, la CMI prolongada hasta las 48 horas de incubación mejora el pronóstico de eficacia porque introduce cierta predictibilidad de la aparición de resistencias durante el tratamiento, sin embargo, si esta selección de resistencias no se tiene en cuenta en la relación FC/FD, el pronóstico establecido puede

conducir al fracaso clínico. A este respecto, estudios recientes destacan la influencia de la aparición de resistencias en el pronóstico de eficacia de los antimicrobianos en múltiples especies (215,235,236,243,244).

### 5.7 Mecanismos que confieren resistencia a quinolonas en los mutantes resistentes

Los mutantes resistentes obtenidos tras la exposición a levofloxacin o moxifloxacin con el sistema de microfiltración mostraron una pronunciada pérdida de sensibilidad a todas las quinolonas y a otros antimicrobianos no relacionados estructuralmente, tetraciclinas, aminoglucósidos, cloranfenicol, macrólidos, betalactámicos y cotrimoxazol. Este patrón de sensibilidad es una reminiscencia del patrón de los mutantes resistentes obtenidos previamente estática (64-67) o dinámicamente *in vitro* (118,138) o en pacientes tratados con ciprofloxacino, aminoglucósidos o ticarcilina-clavulánico (118), demostrando que algunos determinantes de resistencia en *S. maltophilia* son comunes para diferentes clases de antimicrobianos. Esto explicaría por qué la actividad de las tres fluorquinolonas en el sistema de microfiltración fue marcadamente diferente entre cepas sensibles y resistentes a cotrimoxazol (pero no entre cepas sensibles y resistentes a ticarcilina-ácido clavulánico). Recientemente se ha caracterizado que cepas de *S. maltophilia* resistentes a cotrimoxazol presentan mutaciones puntuales en los genes represores de los sistemas SmeDEF y SmeOP-TolC, que confieren resistencia a cotrimoxazol y también otros antimicrobianos entre ellos quinolonas (84,345,346).

La resistencia a quinolonas de los mutantes resistentes obtenidos en esta memoria no estuvo relacionada con mutaciones específicas en los QRDR de los genes *gyrA* y *parC*. Las mutaciones puntuales en los QRDR de las topoisomerasas II y IV (*gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*) constituyen el principal mecanismo de resistencia a quinolonas en especies relacionadas en las cuales la mutación de *gyrA* ocasiona una importante pérdida de sensibilidad a las quinolonas y precede a la posible alteración de *parC* (96). En *S. maltophilia* previos estudios han demostrado que los pocos cambios aminoacídicos que se observan en el GyrA de *S. maltophilia* corresponden a posiciones no relacionadas con la resistencia a fluorquinolonas (97,99,100). En nuestro estudio no analizamos la presencia de mutaciones en *gyrB* o *parE*. Aunque el número de mutaciones presentes en *parE* es alto, estas no contribuyen a la resistencia a quinolonas (97). A diferencia las mutaciones en *gyrB* o *parC* son infrecuentes y de hecho hasta la fecha únicamente se había detectado a un aislado que presentaba un cambio aminoacídico en ParC (Ser→Arg)<sub>80</sub>, parcialmente diferente a la encontrada en otras especies relacionadas como *P. aeruginosa* o *A. baumannii* (97,100). En nuestro estudio identificamos una mutación en *parC* (Sma9 y mutantes) que indujo un cambio en la posición 111, Ala→His con respecto a la secuencia determinada en la cepa sensible ATCC. La relación con la resistencia a quinolonas se presupone baja debido a que se ha observado puntualmente y en una posición muy poco común.

Esta ausencia de mutaciones en el QRDR de los mutantes resistentes ha sido sugerida como una consecuencia de la presencia en el cromosoma de un amplio número de genes de resistencia cuya expresión es suficiente para conferir resistencia clínicamente relevante a las

quinolonas (73). Es decir, el resistoma (347) adquirido durante la evolución en ecosistemas naturales incluso antes de la aparición de los antimicrobianos (68,348), es el que define la adquisición de nuevos mecanismos de resistencia (349). Varios sistemas de expulsión, SmeDEF, SmeYZ y SmeIJK y la proteína SmQnr, perteneciente a la familia de determinantes Qnr codificados en plásmidos, han sido relacionados con la resistencia intrínseca a quinolonas (349,350). También se asocia con la resistencia adquirida a quinolonas en algunos mutantes resistentes aunque en estos confiere una resistencia de bajo nivel (350,351).

La resistencia a quinolonas presente en los mutantes resistentes en esta memoria estuvo relacionada con la sobreexpresión de los sistemas de expulsión SmeABC y SmeDEF. El 72% de los mutantes resistentes estudiados en esta memoria sobreexpresó simultáneamente SmeABC y SmeDEF (13 aislados), un 5% (1 mutante) SmeABC y un 5% (1 mutante) SmeDEF. En cambio en un 16% (3 mutantes) el perfil de múltiple resistencia fue aparentemente similar al de las cepas que sobreexpresan simultáneamente SmeABC y SmeDEF, pero no se detectó la sobreexpresión de ninguno de estos sistemas.

La sobreexpresión de los sistemas SmeDEF y SmeABC ha sido relacionada con la resistencia adquirida de los mutantes resistentes tras la exposición a quinolonas (65-67). La sobreexpresión de estas bombas conduce a una pérdida de sensibilidad, a quinolonas y otros antimicrobianos, y está asociada con mutaciones en los genes reguladores (65-67,79). En *SmeT*, gen regulador de SmeDEF, estas mutaciones son variadas y conducen a diferentes niveles de sobreproducción del sistema y en consecuencia de resistencia en los aislados clínicos (65,79). Estas mutaciones han sido observadas tanto *in vitro* como *in vivo* (67,78,79,352), lo que apoya que los estudios *in vitro* pueden predecir la aparición de mutaciones *in vivo* en los pacientes bajo tratamiento.

A diferencia de SmeABC, el sistema SmeDEF tiene un papel relevante en el resistoma de *S. maltophilia* (66,67). En nuestro estudio todas las cepas progenitoras, excepto Sma22, expresaron el sistema SmeDEF. La expresión del sistema se revela con la detección de la señal *smeD* independientemente de la detección o no de la señal para *smeF* dado que la expresión de los tres componentes del sistema se supone al mismo nivel. Por lo tanto la ausencia de señal para *smeF* que es muy dependiente de las concentraciones de ARN, se consideró un artefacto de la RT-PCR y pudo pasar inadvertida en nuestro estudio debido a que las concentraciones molde de ARN empleadas (0,02 µg) fueron algo inferiores a las de otros trabajos (0,05 µg) (66).

La detección, más (Sma9, Sma19) o menos intensa (Sma71) de *smeF* o la detección más o menos débil de *smeD* o de *smeABC*, indicó una producción más o menos intensa del sistema SmeDEF o SmeABC en las cepas progenitoras. Claramente la exposición a fluorquinolonas seleccionó a la población de organismos con sobreproducción de los sistemas SmeDEF y o SmeABC y claramente estos organismos presentaron diferente sobreproducción de estos sistemas como indicó que se seleccionasen diferentes subpoblaciones resistentes. Un estudio reciente demuestra que las diferentes subpoblaciones de mutantes resistentes en las



poblaciones de *S. maltophilia* son consecuencia de la presión selectiva diferencial ejercida en organismos con diferentes tipos de mutaciones en los genes regulares (67,79, 349,351). Con bajas concentraciones, todos los tipos de mutantes, con alto o bajo nivel de resistencia, serían seleccionados, pero al aumentar la concentración solo se seleccionarían mutantes con alto nivel de resistencia (349,351). La detección de mutantes que sobreexpresan SmeDEF aumenta con el aumento de la concentración de quinolona, pero es mínima entre los mutantes con un alto nivel de resistencia, que predominantemente sobreexpresan el sistema SmeVWX (349,351). Este sistema confiere resistencia de alto nivel en la quinolonas y cloranfenicol pero solo se sobreexpresa en mutantes que no sobreexpresan SmeDEF (349). La sobreexpresión de la bomba SmeVWX ocurre como consecuencia de mutaciones en el gen regulador *smeRv* (76).

Curiosamente el número de subpoblaciones y mutantes resistentes seleccionados durante la exposición a las fluorquinolonas fue menor en las cepas progenitoras que sobreexpresaron más intensamente los sistemas de expulsión (ver figura 28) y también fue la variación en la sensibilidad al prolongar la incubación de la prueba de sensibilidad. Por lo tanto parece correcto afirmar que la variación en los resultados de sensibilidad para las quinolonas, es dependiente de la selección de subpoblaciones que sobreexpresan estas bombas de expulsión y como hemos comentado antes, del tamaño relativo de estas subpoblaciones en la población inicial.

Hasta la fecha solo SmeABC (67), SmeDEF (65,66,70) y SmeVWX (349) han sido caracterizados en mutantes multirresistentes. La bomba SmeOP, confiere baja sensibilidad a aminoglucósidos, ácido nalidíxico, doxiciclina y macrólidos pero se desconoce su papel en los mutantes resistentes (84). La porina TolCsm esta asocia con el sistema SmeOP pero se ha sugerido que podría funcionar con un sistema aparte debido a que la delección de la porina origina un aumento de la sensibilidad a diversos antimicrobianos, entre ellos cotrimoxazol, que no se correlaciona con el fenotipo característico de los aislados que expresan SmeOP (84). Esto se observó también previamente con la porina SmeC de SmeABC, que podría expresarse independientemente de SmeAB y formar parte de otro sistema de expulsión (67).

La contribución de otros sistemas diferentes a SmeDEF o las porinas SmeC o TolCsm al fenotipo de resistencia de nuestras cepas clínicas progenitoras Sma15 o Sma52, que exhibieron una resistencia a ciprofloxacino (CMI =8 µg/ml) idéntica a Sma9, es desconocido. El fenotipo de Sma15 es de hecho similar a Sma9 o incluso Sma19 (CMI =4 µg/ml), pero SmeDEF se expresó menos marcadamente que en estas dos cepas. Por este motivo y dado que esta cepa presentó niveles de resistencia a cotrimoxazol excepcionalmente altos, este fenotipo podría ser atribuido a la sobreexpresión de TolCsm. No obstante tampoco se puede descartar la presencia de integrones tipo1 o de la proteína SmQnr en este aislado clínico en particular. Estos mecanismos adicionales preexistentes en el aislado no fueron analizados en el presente trabajo. Independientemente de esto su contribución en la resistencia adquirida de los mutantes resistentes sería de muy bajo nivel debido a que estos sobreexpresaron SmeDEF y o SmeABC.

Los mutantes resistentes Sma51M, Sm51L y Sma52M demostraron un perfil fenotípico semejante al de los mutantes que expresan SmeVWX, aunque el aumento en la resistencia a

cotrimoxazol no había sido caracterizado previamente (76). Del mismo modo no se puede descartar la contribución de la proteína SmQnr, perteneciente a la familia de determinantes Qnr codificados en plásmidos, en la resistencia intrínseca y adquirida a quinolonas en los aislados clínicos y mutantes resistentes (352). La proteína se relaciona con un bajo nivel de resistencia a quinolonas (352).

Curiosamente la resistencia, especialmente a quinolonas, fue muy similar en los mutantes que sobreexpresaron simultáneamente smeABC y smeDEF pero también en los mutantes que solo sobreexpresaron smeABC o smeDEF o en los mutantes que sobreexpresaron un sistema diferente. Esto sugiere que los sistemas de expulsión en *S. maltophilia* estén reguladas a un nivel superior, tal y como ocurre en *E. coli* a través de los activadores transcripcionales MarA, SoxS y Rob (353). Los sistemas de expulsión están normalmente asociados a funciones fisiológicas (72), y la sobreexpresión simultánea de varios sistemas podría ocasionar una pérdida de la ventaja competitiva por el alto coste biológico para la célula, por lo menos la de SmeDEF (354). Interesantemente los mutantes resistentes obtenidos tras la delección de SmeDEF o SmQnr presentan un nivel de resistencia similar al de las cepas que sobreexpresan los determinantes de resistencia del resistoma. La resistencia en estos mutantes se relaciona con la sobreexpresión de otros sistemas de expulsión y no con la aparición de mutaciones en el QRDR (351), lo que confirma la escasa entidad de este mecanismo en la resistencia de *S. maltophilia* (349).

Estudios recientes confirman SmeDEF se sobreexpresa en un 30-35% de los aislados clínicos (346,355), SmeABC en un 59% (355) y SmeVWX en un 6,5% (346). La prevalencia real en los mutantes resistentes obtenidos en esta memoria descartando los mutantes derivados de cepas progenitoras que expresaron ya estos sistemas sería muy similar, 38% (7 mutantes) para SmeDEF, y del 50% (9 mutantes) para SmeABC. La contribución específica de cada sistema en la resistencia de *S. maltophilia* es difícil de abordar debido a que esta contribución solo puede ser determinada cuando los sistemas que expulsan sustratos similares son eliminados (356).

### 5.8 Inhibidores de las bombas de expulsión como estrategias de tratamiento

Los inhibidores de las bombas de expulsión constituyen una estrategia sólida para frenar el avance de la resistencia en *S. maltophilia* (348). No obstante los resultados obtenidos en esta memoria coinciden con previas observaciones donde se demuestra que tanto reserpina como el inhibidor Phe-Arg- $\beta$  naftilamida (PA $\beta$ N) presentan un impacto muy reducido en la resistencia adquirida en esta especie (357). Curiosamente las reducciones en la CMI de fluorquinolonas, tetraciclina o cloranfenicol se concentran en torno a las cepas que sobreexpresan SmeABC. Estas reducciones son más frecuentes con moxifloxacino, probablemente por ser mejor sustrato de las bombas de expulsión de especies gramnegativas (358). En cualquier caso no presentan efecto alguno en los mutantes resistentes que sobreexpresan SmeDEF (357), no restauran la sensibilidad en los mutantes resistentes y el efecto es aparentemente inexistente en los aislados clínicos. De esta forma, posiblemente el leve efecto en la resistencia de los mutantes resistentes

sea atribuido a la inhibición de otros sistemas expresados simultáneamente y que contribuyan a la resistencia adquirida a las quinolonas (357, 186). Por otro lado recientemente se ha sugerido que la inhibición del resistoma podría incrementar el riesgo de seleccionar mutantes resistentes a concentraciones de antimicrobiano relativamente bajas (349). Así, podría ocurrir que los inhibidores bloqueen efectivamente los sistemas sobreexpresados y que la resistencia nueva sea atribuida a la expresión de otros determinantes no inhibidos (349). Esto podría explicar el ligero aumento de la CMI en las fluorquinolonas y tetraciclina con PA $\beta$ N y en cloranfenicol con reserpina.

PA $\beta$ N, pero no reserpina, restauró casi en la totalidad la CMI del ácido nalidíxico en los mutantes resistentes (186) y redujo la de las cepas progenitoras en una o dos diluciones lo que sugiere que podría tener un efecto específico en los mecanismos de resistencia intrínseca al ácido nalidíxico en esta especie. De hecho la delección de SmeC (SmeABC) no afecta a la sensibilidad del ácido nalidíxico (67). La sobreexpresión de SmeDEF sí está asociada con una pérdida significativa de la sensibilidad al ácido nalidíxico (65), sin embargo su inhibición debería también reflejarse en las fluorquinolonas, tetraciclina y cloranfenicol de los aislados clínicos y mutantes resistentes. Recientemente ha sido identificado en el genoma de *S. maltophilia* (73) el sistema EmrCABsm perteneciente a la familia MFS de transportadores de sustancias hidrofóbicas, que presente un fuerte impacto en la sensibilidad al ácido nalidíxico (359). Estos sistemas incrementan marcadamente el coste biológico (fitness) celular (359) por lo que es posible que se sobreexpresen en situaciones de estrés fisiológico como las producidas por la sobreexpresión de SmeDEF (357). De esta forma, la resistencia a ácido nalidíxico atribuida a la sobreexpresión de SmeDEF sería en realidad un efecto de la compensación del fitness celular producto de la sobreexpresión de SmeDEF.

## **5.9 Optimización de dosis de moxifloxacino en el tratamiento de las infecciones por *S. maltophilia* y probabilidad de éxito en los pacientes infectados**

El paradigma actual de la farmacodinámica antibacteriana, comentado anteriormente, establece la relación clínica de la dosis de antiinfectivo expuesta al paciente y su respuesta y está orientada a conseguir la máxima probabilidad de éxito clínico-microbiológico con la mínima probabilidad de toxicidad (194,220), pero también, de una mínima probabilidad de selección de resistencias (360).

La exposición de *S. maltophilia* al escalamiento y fraccionamiento de la dosis de 400 mg de moxifloxacino con el sistema farmacodinámico de dos compartimentos, si permitió identificar el índice FC/FD que dirige el efecto antibacteriano de moxifloxacino (y probablemente del resto de fluorquinolonas por los antecedentes comentados) en esta especie y la magnitud de la respuesta que pronosticaría el éxito clínico en los pacientes infectados. Los resultados obtenidos sugieren que el efecto antibacteriano de moxifloxacino aumenta significativamente con el aumento de la dosis expuesta con independencia de la expresión o sobreexpresión de los sistemas SmeDEF, SmeABC o de la presencia de un fenotipo de resistencia compatible con el

sistema SmeVWX (Sma51). El modelo de efecto mixto generado relacionó significativamente el aumento del efecto antibacteriano con el aumento de la dosis expuesta y la disminución progresiva de la CMI del microorganismo. De esta forma el efecto antimicrobiano de moxifloxacino sería diferente entre dosis y cada dosis sería diferente en función de la CMI del microorganismo. Según el modelo de efecto mixto, tanto balanceado como no balanceado, la aplicación terapéutica del inhibidor PA $\beta$ N, no modificaría el efecto antibacteriano de dosis de 400 mg o de 800 mg moxifloxacino en *S. maltophilia*, independientemente de la CMI del microorganismo o de los sistemas de expulsión presentes en los aislados clínicos o mutantes resistentes e independientemente de la reducción de la CMI en presencia del inhibidor PA $\beta$ N (ver tabla 38).

El diseño de este experimento, basado en el escalamiento y fracciones dosis terapéuticas y la inclusión de múltiples organismos de diferente sensibilidad permitió valorar un amplio intervalo de exposiciones y consecuentemente detectar cambios progresivos en la respuesta desde el máximo efecto esperable (erradicación) lo que significativamente se asocia con un aumento de la sensibilidad del pronóstico de eficacia de la relación FC/FD (209,248,269). Aun así la covariabilidad de los tres principales índices FC/FD, AUC/CMI,  $C_{max}/CMI$  y  $T_{>CMI}$  puede ser elevada (209,215). De hecho en esta memoria el AUC/CMI, identificado como el índice que dirige la actividad de las quinolonas en múltiples especies grampositivas y negativas tanto en estudios preclínicos (198,215) como en ensayos clínicos (223, 270), fue significativamente, pero no exclusivamente, el índice FC/FD que mejor explicó el efecto antibacteriano obtenido (>90% de la respuesta). La regresión lineal múltiple asoció una parte del efecto antibacteriano al  $T_{>CMI}$  cuando la medida del efecto es el AUBKC y a la  $C_{max}/CMI$  cuando la medida principal del efecto estuvo basada en el recuento de organismos viables al finalizar la exposición. Al margen de la alta covariabilidad que mostraron los tres índices y que una vez reducida demostró que el AUC/CMI es el índice que dirige, exclusivamente, la eficacia del tratamiento en esta especie, las connotaciones asociadas a las medidas de efecto antibacteriano son responsables de estas discrepancias obtenidas con la regresión múltiple. EL AUBKC es una medida que integra el efecto antibacteriano obtenido durante la exposición y es particularmente sensible a los recrecimientos bacterianos. La presencia sostenida de recrecimientos bacterianos en exposiciones bajas y altas originan un patrón de actividad semejante al de los antimicrobianos tiempo dependientes, donde el  $T_{>CMI}$  es fundamental para entender su eficacia (192,361). Del mismo modo el cociente  $C_{max}/CMI$  ha sido descrito como parámetro que dirige la eficacia de las quinolonas cuando se evidencia la aparición de resistencias (195).

La magnitud del cociente AUC/CMI relacionado con el 50% del efecto máximo fue muy inferior al que previamente ha sido identificado tanto para especies grampositivas como gramnegativas (215,215,244,362) independientemente de que el tamaño de las poblaciones analizadas incluyera la posibilidad de introducir o no subpoblaciones resistentes (215,244). Incluyendo esta posibilidad el AUC/CMI<sub>50</sub> para *S. pneumoniae* se situó en 45 h mientras que para *P. aeruginosa* fue superior a las 457 horas (215). En esta memoria esta magnitud se alcanzó con tan sólo 11-

23 horas dependiendo de la medida del efecto antibacteriano (AUBKC o  $r_{24h}$ ). Este hecho y que proporcionalmente los cocientes AUC/CMI relacionados con el 80% (63-307 horas) y 90% (195-1.222 horas) se incrementaran sustancialmente, indicaría que realmente las subpoblaciones sensibles de *S. maltophilia* se inhiben rápidamente con concentraciones muy bajas de moxifloxacino y que la respuesta acumulada al 80% (por ejemplo) obedece a la dificultad para eliminar a las variantes resistentes seleccionadas durante el tratamiento. El AUC/CMI<sub>80</sub>, AUC/CMI<sub>90</sub> y la reducción de la carga bacteriana, por ejemplo en 3 unidades logarítmicas, son las dianas típicamente empleadas en los análisis dosis-respuesta *in vitro* por su relación con la eficacia clínica (215,244,344,363).

El pronóstico de eficacia de la relación FC/FD preclínica se ha centrado hasta hace muy poco tiempo en el efecto sobre las subpoblaciones sensibles sin advertir de los efectos globales que pueden desencadenarse en las subpoblaciones más resistentes, simplemente porque estas subpoblaciones no se incorporan al estudio (244). Cuando el tamaño de la población en el foco infeccioso excede sustancialmente la inversa de la frecuencia de mutación, la probabilidad de que coexistan múltiples subpoblaciones aumenta. La mayor subpoblación será la población de organismos sensibles y cuanto más frecuente sea la aparición del evento mutacional, mayor será la población basal que contenga una mutación puntual concreta (360). La presión antimicrobiana desencadenará diferentes efectos en las subpoblaciones bacterianas (244,360) y estos deben estar presentes en el pronóstico de eficacia para evitar la amplificación de las poblaciones menos sensibles (235,236,244).

La resistencia bacteriana ha sido valorada en modelos dinámicos *in vitro* sin conseguir delinear la relación entre la aparición de resistencias y los cocientes AUC/MI o  $C_{max}/CMI$  simulados (178,279,215,138), bien porque las densidades introducidas fueron lo suficientemente bajas para disponer de subpoblaciones resistentes (178,279), porque el intervalo de exposiciones fue reducido y principalmente por la falta de datos cuantitativos adecuados de la resistencia (138,215). Por este último motivo el efecto antibacteriano de moxifloxacino frente a *S. maltophilia* fue insensible a los cambios del AUC/CMI en un sistema *in vitro* que simuló una dosis de 400 mg frente a diferentes microorganismos (138).

Empleando inóculos de entre  $1-3 \times 10^9$  UFC/sistema, nuestro estudio introdujo en el análisis subpoblaciones resistentes varias veces por encima de la CMI de la población sensible. Nuestros datos sugieren que la selección de estas subpoblaciones resistentes durante el tratamiento con moxifloxacino ocurriría cuando las dosis expuestas se situaran dentro de la ventana de selección de mutaciones. La selección de resistencias fue más pronunciada con cocientes AUC/CMI de entre 18-114 horas, cuando el  $T_{>VSM}$  fue  $>33\%$  del intervalo de dosificación, y en cambio no hubo selección con cocientes AUC/CMI  $\leq 17$  horas o con cocientes  $\geq 120$  horas, relacionados con las exposiciones que se situaron por debajo de la CMI y por encima de la CPM. Estos resultados son consistentes con la simple idea de que la selección de variantes resistentes ocurre en un

intervalo de concentraciones, o ventana, donde la población sensible se inhibe pero no las variantes resistentes (360), a no ser que se alcancen concentraciones que prevengan también su amplificación (243,284), es decir la selección de resistencias ocurre entre la CMI y la CPM, o concentración por encima de la cual se requieren dobles mutaciones, raras, para la selección de resistencias (235,236). Desde un punto de vista clínico es por lo tanto fundamental establecer las exposiciones que favorecen la aparición de resistencias para evitarlas en el foco infeccioso y prevenir la aparición de resistencias (360).

La relación entre el cociente AUC/CMI de moxifloxacino con la resistencia, independientemente de la medida de resistencia utilizada, AUC-PAP<sub>i</sub>/AUC-PAP<sub>i</sub> o Nf/Nix, describió una curva con forma de campana con picos máximos en cocientes de AUC/CMI de entre 35 y 40 horas. Estos cocientes AUC/CMI se relacionaron con una pronunciada reducción de la carga bacteriana,  $\geq 3$ -log UFC/ml, independientemente de si el ajuste fue con el AUBKC o la r24h. Las correlaciones fueron más robustas con el AUC-PAP como ocurre con otras medidas integradas de la resistencia (215,364), pero las estimaciones de la exposición que previnieron de la aparición de resistencias fueron muy similares, especialmente para el AUC-PAP, Nf/Ni4x y Nf/Ni8x. En estos casos el cociente AUC/PAP que previno la aparición de resistencias se situó en torno a las 108 horas. Existen evidencias suficientes que demuestran que este patrón descrito entre el AUC/CMI y la resistencia es universal e independiente de la bacteria (364), es decir, es similar entre organismos de diferente CMI pertenecientes a la misma especie, por lo que el análisis simultáneo con varios microorganismos aumenta la sensibilidad del pronóstico. El ajuste del AUC/CMI con la resistencia empleando una función Gaussiana ha sido documentada *in vitro* con diferentes quinolonas en *B. fragilis* (365) *S. aureus* (235,243), *S. pneumoniae* (236) y *E. coli* (364) con daptomicina, vancomicina y linezolid en *S. aureus* (280,282,366) e *in vivo* en animales de experimentación (217,367,368). Curiosamente los cocientes AUC/CMI relacionados con la máxima selección de resistencias en estos trabajos se situaron alrededor de las 40 horas (235,236).

Recientemente se ha demostrado que el T<sub>VSM</sub> es un buen predictor de la prevención de resistencias *in vivo* e *in vitro* (364,367), aunque previos estudios no mostraron correlación aparente (369,370) o mostraron una correlación sigmoidea muy pobre (217,235,236). Estas discrepancias pueden ser explicadas razonadamente por la influencia de la posición de las concentraciones de antimicrobiano dentro de la VSM en la selección de bacterias resistentes (281,364). Un modelo experimental en conejos demostró que el T<sub>VSM</sub> asociado con la aparición de resistencias puede ser del 30% o del 80% dependiendo del área de la VSM donde fluctúen las concentraciones (371). Esto ocurre porque dependiendo de si las dosis de antimicrobiano fluctúan en torno a la CPM, por encima o por debajo (T>CPM>0), o si fluctúan en torno a la CMI, por encima o por debajo (T>CPM=0), se pueden obtener exposiciones de T<sub>VSM</sub> similares que se asocian con una e aparición de resistencias diferentes (364). La incorporación simultánea de los T<sub>VSM</sub> de dosis con un T>CPM=0 y con un T>CPM>0 en un modelo único, explicaría las discordancias encontradas con el T<sub>VSM</sub> cuando es empleado como predictor de la amplificación

de resistencias (364). Por este mismo motivo, la aparente escasa correlación entre el  $T_{VSM}$  con la resistencia empleando un modelo lineal sigmoideo ( $r^2=0,36$ ), se fortaleció sustancialmente cuando las dosis con un  $T>CPM>0$  y  $T>CPM=0$  fueron tratadas por separado empleando el mismo tipo de modelo de ajuste ( $r^2=0,83-0,99$ ). Más aún, fusionando en un mismo modelo las líneas de tendencia de ambos grupos de dosis desde las respuestas máximas (ver figura 39), se obtendría una curva con forma de campana muy similar a la trazada entre el cociente AUC/CMI y la resistencia, sugiriendo una estrecha relación entre el AUC/CMI y el  $T_{VSM}$  como predictores de la resistencia. Como se muestra en la figura, la selección de resistencias fue más intensa para las dosis con  $T>CPM=0$  que para las dosis con un  $T>CPM>0$  y se asoció a  $T_{VSM}$  críticos para la selección de resistencias diferentes,  $>5\%$  del intervalo de dosificación para las dosis con un  $T>CPM=0$  (rama ascendente, figura 39) y  $>38\%$  del intervalo de dosificación para las dosis con un  $T>CPM>0$  (rama descendente, figura 39). Según este ajuste, la aparición de resistencias en *S. maltophilia* ocurriría con exposiciones por encima de la CMI más cortas que en otras especies grampositivas y gramnegativas (235,364,371).

La fortaleza de nuestras observaciones pudo estar negativamente afectada por la duración del tratamiento (243). Se ha sugerido que tras la selección de subpoblaciones resistentes el número de mutantes en la población será mayor cuanto más largo es el tratamiento (215,235,236,243). De esta forma las estimaciones procedentes de exposiciones antibióticas cortas, como la presentada en esta memoria podrían infravalorar el cociente AUC/CMI que previene la aparición de resistencias (243). No obstante muy recientemente se ha demostrado que la duración de la exposición es decisiva en la determinación del número máximo de mutantes resistentes que se seleccionan pero no en la predicción de los cocientes AUC/CMI que previenen la aparición de mutantes resistentes (283). En cualquier caso la exposición debería ser lo suficientemente larga para permitir la selección de mutantes resistentes y el intervalo de exposiciones lo suficientemente amplio para incluir concentraciones a las que se detectase una selección significativa. Ba y cols, demostraron que la aparición de mutantes resistentes en *S. maltophilia* durante la exposición a ciprofloxacino y moxifloxacino ocurre rápidamente sin variación del tamaño de las subpoblaciones seleccionadas 12 horas después de comenzar la administración (138). Del mismo modo el patrón de actividad de los mutantes resistentes Sma19M y Sma80M2, obtenidos tras la exposición a moxifloxacino (400 mg) en el modelo de microfiltración, sería consistente con el mostrado por Ba y cols en la segunda dosis administrada (138). Con todos estos argumentos el impacto de la duración de nuestra simulación en la estimación de las magnitudes que previene la resistencia debería ser mínimo.

Esta aproximación FC/FD demuestra que las magnitudes de las dianas terapéuticas convencionales (AUC/CMI<sub>80</sub>, AUC/CMI<sub>90</sub> o magnitud asociada con una reducción de la carga bacteriana) que pronostican la eficacia clínica de moxifloxacino en las infecciones por *S. maltophilia*, serían sustancialmente diferentes de las magnitudes diana derivadas del estudio de las subpoblaciones resistentes. Debido a que la aparición de resistencias es uno de los

principales factores desencadenantes del fracaso del tratamiento en los pacientes infectados por *S. maltophilia* (118,340), las dianas basadas en el estudio de las resistencias serán de aplicación preferente para el pronóstico de eficacia de moxifloxacino y de cualquier otro antimicrobiano en esta especie microbiana.

De acuerdo a nuestros datos, cocientes AUC/CMI de moxifloxacino de 108 horas prevendrían de la aparición de resistencias durante el tratamiento y ocasionarían un pronunciado efecto antimicrobiano ( $r_{24h} > 4\text{-log UFC/ml}$ ) en la población bacteriana.

No obstante como se ha demostrado con la simulación de Monte Carlo, la probabilidad de éxito de los pacientes infectados, tratados con dosis de 400 mg de moxifloxacino, sería inferior al 40% y este porcentaje sería muy similar tras múltiples dosis. Aunque la primera dosis es vital en la evolución de procesos severos, se ha sugerido que las estimaciones de eficacia en humanos deberían realizarse empleando concentraciones en estado estacionario (194,222). Moxifloxacino se encuentra disponible por vía oral y por vía intravenosa mostrando AUC<sub>0-24h</sub> bioequivalentes tras la administración de dosis de 400 mg. Presenta una amplia distribución a tejidos y una acumulación especialmente destacable en LRE y macrófagos alveolares (305) y en función de su espectro estaría indicado como tratamiento empírico en bacteriemias o neumonía adquirida en la comunidad y neumonía nosocomial (305,372).

Estas estimaciones de eficacia estarían muy por debajo de las estimaciones basadas en el estudio de sensibilidad que sugerían, apoyándose en los puntos de corte de especies relacionadas (232), una sensibilidad próxima al 90%. Pero también estarían por debajo de las estimaciones de eficacia obtenidas empleando las dianas FC/FD basadas en medidas del efecto antibacteriano. De acuerdo al AUC/CMI<sub>80</sub> de 70 horas, que recordemos se asoció con reducciones de más de 3-log UFC/ml (estimado a través del AUBKC y correlacionado con la  $r_{24h}$ ) la probabilidad de éxito en los pacientes con dosis de 400 mg sería significativamente superior a la probabilidad de éxito empleando la diana basada en la resistencia, es decir un porcentaje significativo de los pacientes tratados de acuerdo a esta aproximación podría asociarse con un fracaso clínico. Dosis superiores, desde un punto de vista farmacocinético, mostraron, independientemente de la diana seleccionada una probabilidad de éxito similar. Esto estuvo relacionado con la eficacia-dependencia del AUC/CMI en moxifloxacino y en el resto de las fluorquinolonas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el punto de corte farmacodinámico para moxifloxacino se situaría en torno a una CMI de 0,12-0,25 µg/ml, es decir, dosis convencionales de 400mg podrían cubrir las infecciones causadas por cepas con esta sensibilidad, muy por debajo del criterio utilizado en esta memoria, extrapolado de especies relacionadas, ( $\leq 1$  µg/ml). Estos resultados desaconsejarían el uso en monoterapia de moxifloxacino en bacteriemias incluso a pesar de la mejora de la probabilidad de éxito con la dosis de 800 mg (60%). Sin embargo podría tener una oportunidad, con una cobertura del 83% de pacientes, en el tratamiento de las neumonías donde la farmacocinética para moxifloxacino es más favorable.



Como hemos reflejado al comparar nuestra serie con otras series de sensibilidad, la probabilidad de éxito en los pacientes es altamente dependiente de la distribución de los aislados sensibles, y especialmente de la acumulación de aislados sensibles con una CMI igual o inferior al punto de corte farmacodinámico establecido en esta memoria. En estas circunstancias la probabilidad de éxito podría ser ligeramente superior a la que hemos demostrado para los aislados clínicos estudiados en este trabajo y en todo caso la probabilidad debería ser revaluada de acuerdo a los estudios de vigilancia particulares de cada centro hospitalario donde fueran de aplicación. No obstante hay que recordar que las series utilizadas como comparadores determinaron la sensibilidad mediante dilución en agar tras 24 horas de incubación, y aunque la variación para moxifloxacino con la prolongación de la incubación no es significativa a diferencia de otras fluorquinolonas, las dianas farmacodinámicas fueron establecidas con este valor de CMI. Por este motivo es preferible que la estimación de la probabilidad de éxito clínico sea establecida de acuerdo a una CMI de 48 horas.

A diferencia de las recomendaciones actuales para el desarrollo de las relaciones FC/FD (305,372), en este estudio simulamos las concentraciones totales de antimicrobianos sin tener en cuenta la unión a proteínas plasmáticas de las fluorquinolonas o mejor dicho, estas fueron obviadas. Adoptando en el análisis de Monte Carlo la fracción libre de moxifloxacino, la estimación de éxito en los pacientes infectados se reduce significativamente. El impacto de la unión a proteínas plasmáticas en el efecto antibacteriano, y en consecuencia en el pronóstico de eficacia clínica conseguido con los sistemas *in vitro*, es un aspecto muy controvertido (372-379) y va más allá de la simple reducción de las concentraciones que se exponen al microorganismo una vez descontado el porcentaje de antimicrobiano unido a las proteínas del plasma (305,372,379). Este problema deriva de las predicciones establecidas por la experimentación animal (que como es obvio ya introduce el fenómeno de la unión a proteínas), en las que la respuesta antimicrobiana se acomoda a la fracción de antimicrobiano no unida a las proteínas una vez que el efecto ya ha sido cuantificado. Es decir, los resultados de eficacia se proponen sobre la fracción libre asumiendo que el fenómeno de la unión a proteínas plasmáticas no es reversible y que esta reversibilidad puede variar en presencia del microorganismo. A este respecto nuestro grupo ha demostrado que cuando los sistemas *in vitro* introducen las condiciones fisiológicas de unión a proteínas del plasma, mediante la simulación directa en suero humano como medio de cultivo o mediante la simulación en un medio de cultivo suplementado con albúmina humana, la actividad de diferentes antimicrobianos, de alta y baja unión a proteínas, no es significativamente diferente de la actividad demostrada con las concentraciones totales (sin considerar la unión a proteínas) y es significativamente diferente de la actividad de la fracción libre teórica, ambos en medios de cultivo que no incluyen las concentraciones fisiológicas de unión a proteínas (372-378).

En estas circunstancias parece más apropiado considerar las estimaciones establecidas en ausencia de parámetros como la unión a proteínas del plasma.

En resumen, esta memoria demuestra que hay alternativas terapéuticas al tratamiento de las infecciones por *S. maltophilia* más allá de los tratamientos clásicos, cotrimoxazol y ticarcilina-ácido clavulánico, considerados de choque. Aplicando aproximaciones farmacocinéticas-farmacodinámicas es posible diseñar estrategias de tratamiento concretas frente a microorganismos complejos de manejar desde un punto de vista clínico-terapéutico para los que la investigación clínica no es un recurso habitual. Este es el primer documento que a través de las relaciones farmacocinéticas-farmacodinámicas establece la probabilidad de éxito de un tratamiento antimicrobiano en los pacientes con infecciones por este microorganismo. Posiblemente, al igual que hemos demostrado con moxifloxacino, las expectativas de eficacia fundadas en los tratamientos actuales, basadas fundamentalmente en la CMI, sean sustancialmente reducidas con aproximaciones similares a la presentada en este estudio.

## **6. CONCLUSIONES**

1. Moxifloxacin y otras fluorquinolonas como levofloxacin o gatifloxacin, con una actividad muy superior a los tratamientos de choque en esta especie, cotrimoxazol y ticarcilina clavulánico, podrían ser de entre los antimicrobianos disponibles para la práctica clínica, candidatos al tratamiento de las infecciones por *Stenotrophomonas maltophilia*. No obstante moxifloxacin sería de preferencia frente a levofloxacin o gatifloxacin debido a que exhibe un mejor perfil farmacocinético-farmacodinámico y un menor riesgo de selección de resistencias.
2. Los resultados de sensibilidad obtenidos con diferentes métodos, incluyendo los recomendados por el CLSI, no se correlacionan entre sí. No obstante los obtenidos con la dilución en agar pronosticarían más adecuadamente la respuesta clínica de las fluorquinolonas y podría ser en consecuencia tenido en consideración como método de referencia en esta especie.
3. Tanto para las quinolonas como para el resto de antibacterianos bactericidas a excepción de los betalactámicos, o bacteriostáticos, la prolongación de la incubación de la prueba de sensibilidad hasta las 48 horas debería ser, por las implicaciones que conlleva, considerado en el método de referencia.
4. La resistencia adquirida a fluorquinolonas en esta especie está principalmente asociada a la sobreproducción de los sistemas de expulsión multidroga SmeABC, SmeDEF y minoritariamente, SmeVWX. La ausencia de mutaciones en los QRDR de las topoisomerasas II y IV podría estar relacionado con la complejidad del resistoma de *Stenotrophomonas maltophilia*.
5. La combinación de las fluorquinolonas con inhibidores de amplio espectro de los sistemas de expulsión no sería una estrategia eficaz. Los inhibidores estudiados, reserpina y fenil-alfa-beta-naftilamida, podrían tener efecto en sistemas de expulsión con una reducida contribución a la resistencia final de los mutantes resistentes pero este efecto no modificaría la respuesta clínica de moxifloxacin independientemente de la dosis administrada.
6. El pronóstico de la CMI en la eficacia clínica de las fluorquinolonas establecido de acuerdo a los actuales puntos de corte microbiológico para esta especie o los adaptados de especies relacionadas, necesitaría complementarse con las aportaciones de la relación farmacocinética-farmacodinámica, que no obstante, debería ser interpretada con extrema prudencia debido a que la rápida selección de resistencias es un factor determinante del posible fracaso del tratamiento con las fluorquinolonas.

7. Esta memoria demuestra la hipótesis de la ventana de selección de mutaciones en *Stenotrophomonas maltophilia*; de acuerdo a esta ventana, la selección de resistencias describe un patrón en U invertida con respecto al cociente AUC/CMI expuesto o al tiempo que las concentraciones se sitúan dentro de la ventana de selección de mutaciones. Exposiciones de moxifloxacino equivalentes a un cociente AUC/CMI >108 horas o un tiempo de exposición dentro de la ventana <38%, para dosis que fluctúen en torno a la CPM (es decir con un  $T > CPM > 0$ ), podrían ser eficaces y evitarían la aparición de resistencias durante el tratamiento.
  
8. De acuerdo a estas magnitudes, dosis convencionales de moxifloxacino serían eficaces frente a cepas con una CMI  $\leq 0,25 \mu\text{g/ml}$ . Este punto de corte farmacodinámico es por lo tanto muy inferior al punto de corte de sensibilidad microbiológica adoptado desde especies relacionadas para las cepas sensibles ( $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ ).  
De acuerdo a este punto de corte farmacodinámico y a las probabilidades de éxito en los pacientes infectados por el microorganismo, la monoterapia con moxifloxacino en las bacteriemias por *Stenotrophomonas maltophilia* a dosis de 400 mg o de 800 mg, sería reconsiderable según los patrones de resistencia locales.  
La monoterapia con moxifloxacino en las neumonías por *Stenotrophomonas maltophilia* sí podría estar indicada.
  
9. Como demuestra esta memoria, con la aproximación farmacocinética-farmacodinámica *in vitro* es posible estudiar alternativas terapéuticas, establecer dosis efectivas y analizar la probabilidad de éxito del tratamiento en los pacientes infectados, supliendo la ausencia de ensayos clínicos que demuestren la eficacia de los tratamientos disponibles en especies complicadas desde un punto de vista clínico-terapéutico, como lo es *Stenotrophomonas maltophilia*. Posiblemente las expectativas de eficacia fundadas en los tratamientos actualmente considerados apropiados en las infecciones por este microorganismo, podrían reducirse sustancialmente empleando aproximaciones similares a la presentada en este trabajo para moxifloxacino, por lo que es muy probable que los actuales puntos de corte microbiológico establecidos por el CLSI para estos antimicrobianos, debieran ser reconsiderados.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

1. Buell CR, Somerville SC. Use of Arabidopsis recombinant inbred lines reveals a monogenic and a novel digenic resistance mechanism to *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. *Plant J.* 1997 Jul;12(1):21-9.
2. Hugh R, Ryschenkow E. *Pseudomonas maltophilia*, an alcaligenes-like species. *J Gen Microbiol.* 1961 Sep;26:123-32.
3. Swings J, De Vos P, Van der Mooter M, De Ley J. Transfer of *Pseudomonas maltophilia* to the genus *Xanthomonas maltophilia* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1983;33:409-413.
4. van Zyl E, Steyn PL. Reinterpretation of the taxonomic position of *Xanthomonas maltophilia* and taxonomic criteria in this genus. Request for an opinion. *Int J Syst Bacteriol.* 1992 Jan;42(1):193-8.
5. Palleroni NJ, Bradbury JF. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia*. *Int J Syst Bacteriol.* 1993 Jul;43(3):606-9.
6. Denton M, Todd NJ, Kerr KG, Hawkey PM, Littlewood JM. Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimens from patients with cystic fibrosis and associated environmental samples. *J Clin Microbiol.* 1998 Jul;36(7):1953-8.
7. Drancourt M, Bollet C, Raoult D. *Stenotrophomonas africana* sp. nov., an opportunistic human pathogen in Africa. *Int J Syst Bacteriol.* 1997 Jan;47(1):160-3.
8. Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev.* 1998 Jan;11(1):57-80.
9. Villarino ME, Stevens LE, Schable B, Mayers G, Miller JM, Burke JP, Jarvis WR. Risk factors for epidemic *Xanthomonas maltophilia* infection/colonization in intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1992 Apr;13(4):201-6.
10. Morrison AJ Jr, Hoffmann KK, Wenzel RP. Associated mortality and clinical characteristics of nosocomial *Pseudomonas maltophilia* in a university hospital. *J Clin Microbiol.* 1986 Jul;24(1):52-5.
11. Fass RJ, Barnishan J, Solomon MC, Ayers LW. In vitro activities of quinolones, beta-lactams, tobramycin, and trimethoprim-sulfamethoxazole against nonfermentative gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 Jun;40(6):1412-8.
12. Marshall WF, Keating MR, Anhalt JP, Steckelberg JM. *Xanthomonas maltophilia*: an emerging nosocomial pathogen. *Mayo Clin Proc.* 1989 Sep;64(9):1097-104.
13. Davin-Regli A, Bollet C, Auffray JP, Saux P, De Micco P. Use of random amplified polymorphic DNA for epidemiological typing of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Hosp Infect.* 1996 Jan;32(1):39-50.
14. Gopalakrishnan R, Hawley HB, Czachor JS, Markert RJ, Bernstein JM. *Stenotrophomonas maltophilia* infection and colonization in the intensive care units of two community hospitals: A study of 143 patients. *Heart Lung.* 1999 Mar-Apr;28(2):134-41.
15. Muder RR, Harris AP, Muller S, Edmond M, Chow JW, Papadakis K, Wagener MW, Bodey GP, Steckelberg JM. Bacteremia due to *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*: a prospective, multicenter study of 91 episodes. *Clin Infect Dis.* 1996 Mar;22(3):508-12.
16. Kerr JR. Inhibition of growth of fungi pathogenic to man by *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Med Microbiol.* 1996 Nov;45(5):380-2.
17. Jakobi M, Winkelmann G, Kaiser D, Kempler C, Jung G, Berg G, Bahl H. Maltophilin: a new antifungal compound produced by *Stenotrophomonas maltophilia* R3089. *J Antibiot (Tokyo).* 1996 Nov;49(11):1101-4.
18. Mortensen JE, Fisher MC, Lipuma JJ. Recovery of *Pseudomonas cepacia* and other *Pseudomonas* species from the environment. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1995; 16: 30-32.
19. Moffet HL, Williams T. Bacteria recovered from distilled water and inhalation equipment. *Am J Child.* 1967; 19: 191-200.

20. Hirai Y. Survival of bacteria under dry conditions; from a viewpoint of nosocomial infection. *J Hosp Infect.* 1991 Nov;19(3):191-200.
21. Rosenthal SL. Sources of pseudomonas and acinetobacter species found in human culture materials. *Am J Clin Pathol.* 1974 Dec;62(6):807-11.
22. Khardori N, Elting L, Wong E, Schable B, Bodey GP. Nosocomial infections due to *Xanthomonas maltophilia* (*Pseudomonas maltophilia*) in patients with cancer. *Rev Infect Dis.* 1990 Nov-Dec;12(6):997-1003.
23. VanCouwenberghe CJ, Farver TB, Cohen SH. Risk factors associated with isolation of *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* in clinical specimens. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997 May;18(5):316-21.
24. Laing FP, Ramotar K, Read RR, Alfieri N, Kureishi A, Henderson EA, Louie TJ. Molecular epidemiology of *Xanthomonas maltophilia* colonization and infection in the hospital environment. *J Clin Microbiol.* 1995 Mar;33(3):513-8.
25. Yao JD, Conly JM, Krajden M. Molecular typing of *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* by DNA macrorestriction analysis and random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol.* 1995 Aug;33(8):2195-8.
26. VanCouwenberghe CJ, Cohen SH, Tang YJ, Gumerlock PH, Silva J Jr. Genomic fingerprinting of epidemic and endemic strains of *Stenotrophomonas maltophilia* (formerly *Xanthomonas maltophilia*) by arbitrarily primed PCR. *J Clin Microbiol.* 1995 May;33(5):1289-91.
27. Ubeda P, Salavert M, Giner S, Jarque I, Lopez-Aldeguer J, Perez-Belles C, Gobernado M. Bacteremia caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a clinical-epidemiological study and resistance profile. *Rev Esp Quimioter.* 1998 Sep;11(3):205-15.
28. Julve R, Rovira E, Belda A, Prat J, Escoms R, Albert A, Gonzalvo F. Clinical manifestations of *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* infection. *An Med Interna.* 1998 Sep;15(9):476-80.
29. Elting LS, Khardori N, Bodey GP, Fainstein V. Nosocomial infection caused by *Xanthomonas maltophilia*: a case-control study of predisposing factors. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1990 Mar;11(3):134-8.
30. Hanes SD, Demirkan K, Tolley E, Boucher BA, Croce MA, Wood GC, Fabian TC. Risk factors for late-onset nosocomial pneumonia caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in critically ill trauma patients. *Clin Infect Dis.* 2002 Aug 1;35(3):228-35.
31. Metan G, Uzun O. Impact of initial antimicrobial therapy in patients with bloodstream infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Sep;49(9):3980-1.
32. Lai CH, Chi CY, Chen HP, Chen TL, Lai CJ, Fung CP, Yu KW, Wong WW, Liu CY. Clinical characteristics and prognostic factors of patients with *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. *J Microbiol Immunol Infect.* 2004 Dec;37(6):350-8.
33. Micozzi A, Venditti M, Monaco M, Friedrich A, Taglietti F, Santilli S, Martino P. Bacteremia due to *Stenotrophomonas maltophilia* in patients with hematologic malignancies. *Clin Infect Dis.* 2000 Sep;31(3):705-11.
34. Senol E, DesJardin J, Stark PC, Barefoot L, Snyderman DR. Attributable mortality of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2002 Jun 15;34(12):1653-6.
35. Kataoka D, Fujiwara H, Kawakami T, Tanaka Y, Tanimoto A, Ikawa S, Tanaka Y. The indirect pathogenicity of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Int J Antimicrob Agents.* 2003 Dec;22(6):601-6.
36. Geiger AM, Hogardt M, Heesemann J. *Burkholderia/Stenotrophomonas*. *Contrib Microbiol.* 2001;8:20-34.



37. Rogues AM, Maugein J, Allery A, Fleureau C, Boulestreau H, Surcin S, Bebear C, Janvier G, Gachie JP. Electronic ventilator temperature sensors as a potential source of respiratory tract colonization with *Stenotrophomonas maltophilia*. J Hosp Infect. 2001 Dec;49(4):289-92.
38. Orr K, Gould FK, Sisson PR, Lightfoot NF, Freeman R, Burdett D. Rapid inter-strain comparison by pyrolysis mass spectrometry in nosocomial infection with *Xanthomonas maltophilia*. J Hosp Infect. 1991 Mar;17(3):187-95.
39. Sales P, Garcia R, Saballs P, Drobnic L, Gimeno JL. Community-acquired bacteremia and pneumonia caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in a patient with AIDS. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1998 Nov;16(9):437.
40. Korn JE, Burke R, O'Donnell C, Smail E. An outbreak of *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* with reusable interline ventilator temperature probes. Infect Control Hosp Epidemiol. 1996;17(Supl):48.
41. Turner-Hubbard K, Hadley WK, Geberding JL, Chambers HF, Perdrew-Remington F. Bronchoscope sterilization failure causing contamination of bronchoalveolar lavage with *Xanthomonas (Stenotrophomonas) maltophilia*. Infect Control Hosp Epidemiol. 1996;17(Supl.):P43.
42. Gladman G, Connor PJ, Williams RF, David TJ. Controlled study of *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas maltophilia* in cystic fibrosis. Arch Dis Child. 1992 Feb;67(2):192-5.
43. Ballesteros S, Virseda I, Escobar H, Suarez L, Baquero F. *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1995 Aug;14(8):728-9.
44. Valdezate S, Vindel A, Maiz L, Baquero F, Escobar H, Canton R. Persistence and variability of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis patients, Madrid, 1991-1998. Emerg Infect Dis. 2001 Jan-Feb;7(1):113-22.
45. Karpati F, Malmberg AS, Alfredsson H, Hjelte L, Strandvik B. Bacterial colonisation with *Xanthomonas maltophilia*-a retrospective study in a cystic fibrosis patient population. Infection. 1994 Jul-Aug;22(4):258-63.
46. Demko CA, Stern RC, Doershuk CF. *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis: incidence and prevalence. Pediatr Pulmonol. 1998 May;25(5):304-8.
47. Labarca JA, Leber AL, Kern VL, Territo MC, Brankovic LE, Bruckner DA, Pegues DA. Outbreak of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in allogeneic bone marrow transplant patients: role of severe neutropenia and mucositis. Clin Infect Dis. 2000 Jan;30(1):195-7.
48. Jang TN, Wang FD, Wang LS, Liu CY, Liu IM. *Xanthomonas maltophilia* bacteremia: an analysis of 32 cases. J Formos Med Assoc. 1992 Dec;91(12):1170-6.
49. Sarvamangala Devi JN, Venkatesh A, Shivananda PG. Neonatal infections due to *Pseudomonas maltophilia*. Indian Pediatr. 1984 Jan;21(1):72-4.
50. Muder RR, Yu VL, Dummer JS, Vinson C, Lumish RM. Infections caused by *Pseudomonas maltophilia*. Expanding clinical spectrum. Arch Intern Med. 1987 Sep;147(9):1672-4.
51. Zuravleff JJ, Yu VL. Infections caused by *Pseudomonas maltophilia* with emphasis on bacteremia: case reports and a review of the literature. Rev Infect Dis. 1982 Nov-Dec;4(6):1236-46.
52. Szeto CC, Li PK, Leung CB, Yu AW, Lui SF, Lai KN. *Xanthomonas maltophilia* peritonitis in uremic patients receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis. Am J Kidney Dis. 1997 Jan;29(1):91-5.
53. Dapena F, Selgas R, Garcia-Perea A, Del Peso G, Bajo MA, Fernandez Reyes MJ, Jimenez C, Sanchez C, Munoz I, De Alvaro F. Clinical significance of exit-site infections due to *Xanthomonas* in CAPD patients: a comparison with *Pseudomonas* infection. Nephrol Dial Transplant. 1994;9(12):1774-7.
54. Cheng VC, Lo WK, Woo PC, Chan SB, Cheng SW, Ho M, Yuen KY. Polymicrobial outbreak of intermittent peritoneal dialysis peritonitis during external wall renovation at a dialysis center. Perit Dial Int. 2001 May-Jun;21(3):296-301.

55. Vartivarian SE, Papadakis KA, Palacios JA, Manning JT Jr, Anaissie EJ. Mucocutaneous and soft tissue infections caused by *Xanthomonas maltophilia*. A new spectrum. *Ann Intern Med*. 1994 Dec 15;121(12):969-73.
56. Penland RL, Wilhelmus KR. *Stenotrophomonas maltophilia* ocular infections. *Arch Ophthalmol*. 1996 Apr;114(4):433-6.
57. Mino de Kaspar H, Grasbon T, Kampik A. Automated surgical equipment requires routine disinfection of vacuum control manifold to prevent postoperative endophthalmitis. *Ophthalmology*. 2000 Apr;107(4):685-90.
58. Schable B, Rhoden DL, Jarvis WR, Miller JM. Prevalence of serotypes of *Xanthomonas maltophilia* from world-wide sources. *Epidemiol Infect*. 1992 Apr;108(2):337-41.
59. Bingen EH, Denamur E, Lambert-Zechovsky NY, Bourdois A, Mariani-Kurkdjian P, Cezard JP, Navarro J, Elion J. DNA restriction fragment length polymorphism differentiates crossed from independent infections in nosocomial *Xanthomonas maltophilia* bacteremia. *J Clin Microbiol*. 1991 Jul;29(7):1348-50.
60. Gerner-Smidt P, Bruun B, Arpi M, Schmidt J. Diversity of nosocomial *Xanthomonas maltophilia* (*Stenotrophomonas maltophilia*) as determined by ribotyping. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1995 Feb;14(2):137-40.
61. Wust J, Frei R, Gunthard H, Altwegg M. Analysis of restriction fragment length polymorphism and ribotyping of multiresistant *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from persisting lung infection in a cystic fibrosis patient. *Scand J Infect Dis*. 1995;27(5):499-502.
62. Talon D, Bailly P, Leprat R, Godard C, Deconnink E, Cahn JY, Michel-Briand Y. Typing of hospital strains of *Xanthomonas maltophilia* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Hosp Infect*. 1994 Jul;27(3):209-17.
63. Chatelut M, Dournes JL, Chabanon G, Marty N. Epidemiological typing of *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* by PCR. *J Clin Microbiol*. 1995 Apr;33(4):912-4.
64. Lecso-Bornet M, Pierre J, Sarkis-Karam D, Lubera S, Bergogne-Berezin E. Susceptibility of *Xanthomonas maltophilia* to six quinolones and study of outer membrane proteins in resistant mutants selected in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992 Mar;36(3):669-71.
65. Alonso A, Martinez JL. Cloning and characterization of SmeDEF, a novel multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Nov;44(11):3079-86.
66. Zhang L, Li XZ, Poole K. SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Dec;45(12):3497-503.
67. Li XZ, Zhang L, Poole K. SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Feb;46(2):333-43.
68. Berg G, Roskot N, Smalla K. Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Clin Microbiol*. 1999 Nov;37(11):3594-600.
69. Zhang L, Li XZ, Poole K. Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: involvement of a multidrug efflux system. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Feb;44(2):287-93.
70. Alonso A, Martinez JL. Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 May;41(5):1140-2.
71. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*. 1994 Apr 15;264(5157):382-8.
72. Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J Bacteriol*. 1996 Oct;178(20):5853-9.

73. Crossman LC, Gould VC, Dow JM, Vernikos GS, Okazaki A, Sebahia M, Saunders D, Arrowsmith C, Carver T, Peters N, Adlem E, Kerhornou A, Lord A, Murphy L, Seeger K, Squares R, Rutter S, Quail MA, Rajandream MA, Harris D, Churcher C, Bentley SD, Parkhill J, Thomson NR, Avison MB. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol.* 2008 Apr 17;9(4):R74.
74. Huang YW, Liou RS, Lin YT, Huang HH, Yang TC. A linkage between *SmeIJK* efflux pump, cell envelope integrity, and  $\sigma^E$ -mediated envelope stress response in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS One.* 2014 Nov 12;9(11):e111784.
75. Lin YT, Huang YW, Liou RS, Chang YC, Yang TC. MacABCsm, an ABC-type tripartite efflux pump of *Stenotrophomonas maltophilia* involved in drug resistance, oxidative and envelope stress tolerances and biofilm formation. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Dec;69(12):3221-6.
76. Chen CH, Huang CC, Chung TC, Hu RM, Huang YW, Yang TC. Contribution of resistance-nodulation-division efflux pump operon *smeU1-V-W-U2-X* to multidrug resistance of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Dec;55(12):5826-33.
77. Gould VC, Okazaki A, Avison MB. Coordinate hyperproduction of *SmeZ* and *SmeJK* efflux pumps extends drug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jan;57(1):655-7.
78. Alonso A, Martínez JL. Expression of multidrug efflux pump *SmeDEF* by clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Jun;45(6):1879-81.
79. Sanchez P, Alonso A, Martínez JL. Regulatory regions of *smeDEF* in *Stenotrophomonas maltophilia* strains expressing different amounts of the multidrug efflux pump *SmeDEF*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jun;48(6):2274-6.
80. Sánchez MB, Martínez JL. Regulation of *Smqnr* expression by *SmqnrR* is strain-specific in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Oct;70(10):2913-4.
81. Peng WT, Nester EW. Characterization of a putative RND-type efflux system in *Agrobacterium tumefaciens*. *Gene.* 2001 May 30;270(1-2):245-52.
82. Lin YT, Huang YW, Chen SJ, Chang CW, Yang TC. The *SmeYZ* efflux pump of *Stenotrophomonas maltophilia* contributes to drug resistance, virulence-related characteristics, and virulence in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Jul;59(7):4067-73.
83. García-León G, Hernández A, Hernando-Amado S, Alavi P, Berg G, Martínez JL. A function of *SmeDEF*, the major quinolone resistance determinant of *Stenotrophomonas maltophilia*, is the colonization of plant roots. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Aug;80(15):4559-65.
84. Lin CW, Huang YW, Hu RM, Yang TC. *SmeOP-TolCSm* efflux pump contributes to the multidrug resistance of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(4):2405-8.
85. Denton M, Keer V, Hawkey PM. Correlation between genotype and beta-lactamases of clinical and environmental strains of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother.* 1999 Apr;43(4):555-8.
86. Paton R, Miles RS, Amyes SG. Biochemical properties of inducible beta-lactamases produced from *Xanthomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994 Sep;38(9):2143-9.
87. Saino Y, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and properties of an inducible cephalosporinase from *Pseudomonas maltophilia* GN12873. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984 Mar;25(3):362-5.
88. Avison MB, Higgins CS, von Heldreich CJ, Bennett PM, Walsh TR. Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2 beta-lactamase genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Feb;45(2):413-9.
89. Walsh TR, Hall L, Assinder SJ, Nichols WW, Cartwright SJ, MacGowan AP, Bennett PM. Sequence analysis of the L1 metallo-beta-lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochim Biophys Acta.* 1994 Jun 21;1218(2):199-201.

90. Sanschagrín F, Dufresne J, Levesque RC. Molecular heterogeneity of the L-1 metallo-beta-lactamase family from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 May;42(5):1245-8.
91. Avison MB, Higgins CS, Ford PJ, von Heldreich CJ, Walsh TR, Bennett PM. Differential regulation of L1 and L2 beta-lactamase expression in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother*. 2002 Feb;49(2):387-9.
92. Avison MB, von Heldreich CJ, Higgins CS, Bennett PM, Walsh TR. A TEM-2 beta-lactamase encoded on an active Tn1-like transposon in the genome of a clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother*. 2000 Dec;46(6):879-84.
93. Rahmati-Bahram A, Magee JT, Jackson SK. Temperature-dependent aminoglycoside resistance in *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia*; alterations in protein and lipopolysaccharide with growth temperature. *J Antimicrob Chemother*. 1996 Apr;37(4):665-76.
94. Lambert T, Ploy MC, Denis F, Courvalin P. Characterization of the chromosomal aac(6')-Iz gene of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Oct;43(10):2366-71.
95. Li XZ, Zhang L, McKay GA, Poole K. Role of the acetyltransferase AAC(6')-Iz modifying enzyme in aminoglycoside resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Apr;51(4):803-11.
96. Hooper DC. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat*. 1999 Feb;2(1):38-55.
97. Valdezate S, Vindel A, Echeita A, Baquero F, Cantó R. Topoisomerase II and IV quinolone resistance-determining regions in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates with different levels of quinolone susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Mar;46(3):665-71.
98. Ribera A, Doménech-Sánchez A, Ruiz J, Benedi VJ, Jimenez de Anta MT, Vila J. Mutations in *gyrA* and *parC* QRDRs are not relevant for quinolone resistance in epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Microb Drug Resist*. 2002 Winter;8(4):245-51.
99. Trigo Daporta M, Muñoz Bellido JL, García-Rodríguez JA. Topoisomerases mutations and fluoroquinolone resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Int J Antimicrob Agents*. 2004 Nov;24(5):520
100. Wisplinghoff H, Decker M, Haefs C, Krut O, Plum G, Seifert H. Mutations in *gyrA* and *parC* associated with resistance to fluoroquinolones in epidemiologically defined clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Jan;51(1):177-80.
101. Barbolla R, Catalano M, Orman BE, Famiglietti A, Vay C, Smayevsky J, Centrón D, Piñeiro SA. Class 1 integrons increase trimethoprim-sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Feb;48(2):666-9.
102. Toleman MA, Bennett PM, Bennett DM, Jones RN, Walsh TR. Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of *sul* genes. *Emerg Infect Dis*. 2007 Apr;13(4):559-65.
103. Chang LL, Lin HH, Chang CY, Lu PL. Increased incidence of class 1 integrons in trimethoprim/sulfamethoxazole-resistant clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother*. 2007 May;59(5):1038-9.
104. Hu LF, Chang X, Ye Y, Wang ZX, Shao YB, Shi W, Li X, Li JB. *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of *sul* and *dfrA* genes in a plasmid-mediated class 1 integron. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 Mar;37(3):230-4
105. Shimizu K, Kikuchi K, Sasaki T, Takahashi N, Ohtsuka M, Ono Y, Hiramatsu K. *Smqnr*, a new chromosome-carried quinolone resistance gene in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Oct;52(10):3823-5.
106. Sánchez MB, Martínez JL. *SmQnr* contributes to intrinsic resistance to quinolones in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jan;54(1):580-1.

107. del Toro MD, Rodríguez-Bano J, Herrero M, Rivero A, García-Ordóñez MA, Corzo J, Pérez-Cano R; Grupo Andaluz para el Estudio de las Enfermedades Infecciosas. Clinical epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* colonization and infection: a multicenter study. *Medicine* (Baltimore). 2002 May;81(3):228-39.
108. Farrell DJ, Sader HS, Jones RN. Antimicrobial susceptibilities of a worldwide collection of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates tested against tigecycline and agents commonly used for *S. maltophilia* infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jun;54(6):2735-7.
109. Nicodemo AC, Araujo MR, Ruiz AS, Gales AC. In vitro susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates: comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution methods. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Apr;53(4):604-8.
110. Yao JD, Louie M, Louie L, Goodfellow J, Simor AE. Comparison of E test and agar dilution for antimicrobial susceptibility testing of *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia*. *J Clin Microbiol*. 1995 May;33(5):1428-30.
111. Jones RN, Huynh HK, Biedenbach DJ, Fritsche TR, Sader HS. Doripenem (S-4661), a novel carbapenem: comparative activity against contemporary pathogens including bactericidal action and preliminary in vitro methods evaluations. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Jul;54(1):144-54.
112. Weiss K, Restieri C, De Carolis E, Laverdière M, Guay H. Comparative activity of new quinolones against 326 clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother*. 2000 Mar;45(3):363-5.
113. Schmitz FJ, Sadurski R, Verhoef J, Milatovic D, Fluit AC. Typing of 154 clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* by pulsed-field gel electrophoresis and determination of the in vitro susceptibilities of these strains to 28 antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 2000 Jun;45(6):921-3.
114. Biedenbach DJ, Croco MA, Barrett TJ, Jones RN. Comparative in vitro activity of gatifloxacin against *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia* species isolates including evaluation of disk diffusion and E test methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999 Jun;18(6):428-31.
115. Sahm DF, Critchley IA, Kelly LJ, Karlowsky JA, Mayfield DC, Thornsberry C, Mauriz YR, Kahn J. Evaluation of current activities of fluoroquinolones against gram-negative bacilli using centralized in vitro testing and electronic surveillance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Jan;45(1):267-74.
116. Wang CH, Lin JC, Lin HA, Chang FY, Wang NC, Chiu SK, Lin TY, Yang YS, Kan LP, Yang CH, Chan MC, Yeh KM. Comparisons between patients with trimethoprim-sulfamethoxazole-susceptible and trimethoprim-sulfamethoxazole-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* monomicrobial bacteremia: A 10-year retrospective study. *J Microbiol Immunol Infect*. 2014 Jul 28. pii: S1684-1182(14)00116-9.
117. Betriu C, Sánchez A, Palau ML, Gómez M, Picazo JJ. Antibiotic resistance surveillance of *Stenotrophomonas maltophilia*, 1993-1999. *J Antimicrob Chemother*. 2001 Jul;48(1):152-4.
118. Garrison MW, Anderson DE, Campbell DM, Carroll KC, Malone CL, Anderson JD, Hollis RJ, Pfaller MA. *Stenotrophomonas maltophilia*: emergence of multidrug-resistant strains during therapy and in an in vitro pharmacodynamic chamber model. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Dec;40(12):2859-64.
119. Poulos CD, Matsumura SO, Willey BM, Low DE, McGeer A. In vitro activities of antimicrobial combinations against *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Oct;39(10):2220-3.
120. Zelenitsky SA, Iacovides H, Ariano RE, Harding GK. Antibiotic combinations significantly more active than monotherapy in an in vitro infection model of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005 Jan;51(1):39-43.
121. Sevillano D., Valero E., García R., Calvo A., Alou L., Gómez-Lus M.L.. Actividad sinérgica de cefepima- ácido clavulánico frente a aislados clínicos de *Stenotrophomonas maltophilia*. *Rev. Esp. Quimioter*. 2001; 14 (supl. 1): 190.

122. Muñoz Bellido JL, Muñoz Criado S, García García I, Alonso Manzanares MA, Gutiérrez Zufiaurre MN, García-Rodríguez JA. In vitro activities of beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations against *Stenotrophomonas maltophilia*: correlation between methods for testing inhibitory activity, time-kill curves, and bactericidal activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Dec;41(12):2612-5.
123. Lecso-Bornet M, Bergogne-Bérézin E. Susceptibility of 100 strains of *Stenotrophomonas maltophilia* to three beta-lactams and five beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations. *J Antimicrob Chemother*. 1997 Nov;40(5):717-20
124. Jones RN, Sader HS, Beach ML. Contemporary in vitro spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18569 strains non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Int J Antimicrob Agents*. 2003 Dec;22(6):551-6.
125. Gales AC, Jones RN, Forward KR, Linares J, Sader HS, Verhoef J. Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999). *Clin Infect Dis*. 2001 May 15;32 Suppl 2:S104-13.
126. Pankuch GA, Jacobs MR, Rittenhouse SF, Appelbaum PC. Susceptibilities of 123 strains of *Xanthomonas maltophilia* to eight beta-lactams (including beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations) and ciprofloxacin tested by five methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994 Oct;38(10):2317-22.
127. Sader HS, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents*. 2005 Feb;25(2):95-109.
128. Carroll KC, Cohen S, Nelson R, Campbell DM, Claridge JD, Garrison MW, Kramp J, Malone C, Hoffmann M, Anderson DE. Comparison of various in vitro susceptibility methods for testing *Stenotrophomonas maltophilia*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998 Nov;32(3):229-35.
129. Rouse M.S., Tallan B.M., Henry N.K., Steckelberg J.M., Wilson W.R.. Treatment of *Xanthomonas maltophilia* experimental pneumonia. *Chest*. 1991;12 (supl.): 147S.
130. Howe RA, Wilson MP, Walsh TR, Millar MR. Susceptibility testing of *Stenotrophomonas maltophilia* to carbapenems. *J Antimicrob Chemother*. 1997 Jul;40(1):13-7.
131. Traub WH, Leonhard B, Bauer D. Antibiotic susceptibility of *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*: comparative (NCCLS criteria) evaluation of antimicrobial drugs with the agar dilution and the agar disk diffusion (Bauer-Kirby) tests. *Chemotherapy*. 1998 May-Jun;44(3):164-73.
132. Tsiodras S, Pittet D, Carmeli Y, Eliopoulos G, Boucher H, Harbarth S. Clinical implications of *stenotrophomonas maltophilia* resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole: a study of 69 patients at 2 university hospitals. *Scand J Infect Dis*. 2000;32(6):651-6.
133. Garcia-Rodríguez JA, Garcia Sanchez JE, Munoz Bellido JL, Garcia Garcia MI, Garcia Sanchez E. Kinetics of antimicrobial activity of aztreonam/clavulanic acid (2:1) against *Xanthomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother*. 1991 Apr;27(4):552-4.
134. Giamarellos-Bourboulis EJ, Karnesis L, Galani I, Giamarellou H. In vitro killing effect of moxifloxacin on clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Dec;46(12):3997-9.
135. Valdezate S, Vindel A, Loza E, Baquero F, Cantón R. Antimicrobial susceptibilities of unique *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 May;45(5):1581-4.
136. Gesu GP, Marchetti F, Piccoli L, Cavallero A. Levofloxacin and ciprofloxacin in vitro activities against 4,003 clinical bacterial isolates collected in 24 Italian laboratories. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Feb;47(2):816-9
137. Cohn ML, Waites KB. Antimicrobial activities of gatifloxacin against nosocomial isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* measured by MIC and time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Jul;45(7):2126-8.

138. Ba BB, Feghali H, Arpin C, Saux MC, Quentin C. Activities of ciprofloxacin and moxifloxacin against *Stenotrophomonas maltophilia* and emergence of resistant mutants in an in vitro pharmacokinetic-pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Mar;48(3):946-53.
139. Bonfiglio G, Cascone C, Azzarelli C, Cafiso V, Marchetti F, Stefani S. Levofloxacin in vitro activity and time-kill evaluation of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2000 Jan;45(1):115-7.
140. Howe R. A. Macgowan A. P. The susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* (SMA) to newer quinolones and their potential role in therapy. 39<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agent and Chemotherapy. 1999. Abstract 2279. San Francisco, USA.
141. Visalli MA, Jacobs MR, Appelbaum PC. Activities of three quinolones, alone and in combination with extended-spectrum cephalosporins or gentamicin, against *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Aug;42(8):2002-5.
142. Lemmen SW, Hafner H, Reinert RR, Zolldann D, Kummerer K, Lutticken R. Comparison of serum bactericidal activity of ceftazidime, ciprofloxacin and meropenem against *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother*. 2001 Jan;47(1):118-20.
143. Wang YL, Scipione MR, Dubrovskaya Y, Papadopoulos J. Monotherapy with fluoroquinolone or trimethoprim-sulfamethoxazole for treatment of *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(1):176-82.
144. Friedman ND, Korman TM, Fairley CK, Franklin JC, Spelman DW. Bacteraemia due to *Stenotrophomonas maltophilia*: an analysis of 45 episodes. *J Infect*. 2002 Jul;45(1):47-53.
145. Tripodi MF, Andreana A, Sarnataro G, Ragone E, Adinolfi LE, Utili R. Comparative activities of isepamicin, amikacin, cefepime, and ciprofloxacin alone or in combination with other antibiotics against *Stenotrophomonas maltophilia*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001 Jan;20(1):73-5.
146. Sader HS, Flamm RK, Jones RN. Tigecycline activity tested against antimicrobial resistant surveillance subsets of clinical bacteria collected worldwide (2011). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Jun;76(2):217-21.
147. Tekçe YT, Erbay A, Cabadak H, Sen S. Tigecycline as a therapeutic option in *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *J Chemother*. 2012 Jun;24(3):150-4.
148. Wei C, Ni W, Cai X, Cui J. A Monte Carlo pharmacokinetic/pharmacodynamic simulation to evaluate the efficacy of minocycline, tigecycline, moxifloxacin, and levofloxacin in the treatment of hospital-acquired pneumonia caused by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Infect Dis (Lond)*. 2015 Dec;47(12):846-51.
149. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J Antimicrob Chemother*. 2011 Sep;66(9):2070-4.
150. Steele-Moore L., Furness K., Stark K., Holloway W. *Stenotrophomonas maltophilia* time-kill curves with trovafloxacin plus cefepime and trovafloxacin plus cefoperazone. 21st International Congress of Chemotherapy. 1999. Abstract P144. Birmingham, U.K.
151. Fung-Tomc JC, Gradelski E, Valera L, Huczko E, Bonner DP. Synergistic activity of the novel des-fluoro(6) quinolone, garenoxacin (BMS-284756), in combination with other antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa* and related species. *Int J Antimicrob Agents*. 2002 Jul;20(1):57-60.
152. Nicodemo AC, Paez JI. Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Apr;26(4):229-37.
153. Gould IM, Milne K. In-vitro pharmacodynamic studies of piperacillin/tazobactam with gentamicin and ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother*. 1997 Jan;39(1):53-61.

154. Chin N., Whittier S., Della-Latta P.. In vitro combination of polymyxin B and rifampin with beta-lactams, quinolones, and TMP/SXT against *Stenotrophomonas maltophilia*. 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1999. Abstract 2280. San Francisco, USA.
155. Bonfiglio G, Livermore DM. Effect of media composition on the susceptibility of *Xanthomonas maltophilia* to beta-lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother. 1991 Dec;28(6):837-42.
156. Bonfiglio G, Livermore DM. Zinc ions and medium-dependent susceptibility to beta-lactams in *Xanthomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother. 1994 Jan;33(1):181-3.
157. Cooke P, Heritage J, Kerr K, Hawkey PM, Newton KE. Different effects of zinc ions on in vitro susceptibilities of *Stenotrophomonas maltophilia* to imipenem and meropenem. Antimicrob Agents Chemother. 1996 Dec;40(12):2909-10.
158. NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; Approved standards sixth edition. NCCLS document/-A6. NCCLS, Wayne, PA, US, 2003.
159. King A. Recommendations for susceptibility tests on fastidious organisms and those requiring special handling. J Antimicrob Chemother. 2001 Jul;48 Suppl 1:77-80.
160. Hohl P, Frei R, Aubry P. In vitro susceptibility of 33 clinical case isolates of *Xanthomonas maltophilia*. Inconsistent correlation of agar dilution and of disk diffusion test results. Diagn Microbiol Infect Dis. 1991 Sep-Oct;14(5):447-50.
161. Arpi M, Victor MA, Mortensen I, Gottschau A, Bruun B. In vitro susceptibility of 124 *Xanthomonas maltophilia* (*Stenotrophomonas maltophilia*) isolates: comparison of the agar dilution method with the E-test and two agar diffusion methods. APMIS. 1996 Feb;104(2):108-14.
162. Wiles T., Turng B., Towns V., Lilli H., Wulff S. Comparative studies of antibiotic susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* with trimethoprim/sulfamethoxazole using different test methodologies. Clin Microbiol Infect. 1998. 5 (Supl. 3): 370.
163. Wheat PF, Winstanley TG, Spencer RC. Effect of temperature on antimicrobial susceptibilities of *Pseudomonas maltophilia*. J Clin Pathol. 1985 Sep;38(9):1055-8.
164. Wilcox MH, Winstanley TG, Spencer RC. Outer membrane protein profiles of *Xanthomonas maltophilia* isolates displaying temperature-dependent susceptibility to gentamicin. J Antimicrob Chemother. 1994 Mar;33(3):663-6.
165. Rahmati-Bahram A, Magee JT, Jackson SK. Growth temperature-dependent variation of cell envelope lipids and antibiotic susceptibility in *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia*. J Antimicrob Chemother. 1995 Aug;36(2):317-26.
166. Rahmati-Bahram A, Magee JT, Jackson SK. Effect of temperature on aminoglycoside binding sites in *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother. 1997 Jan;39(1):19-24.
167. Hejnar P, Kolar M, Hajek V, Koukalova D, Hamal P. Occurrence of variants with temperature-dependent susceptibility (TDS) to antibiotics among *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains. Folia Microbiol (Praha). 2001;46(2):151-5.
168. Howe R.A., Bowker K.E., Wootton M., Bennett P.M., Walsh T.R., Macgowan A.P.. Selective temperature dependence in susceptibility of 66 clinical strains of *Stenotrophomonas maltophilia* (Sma) to 31 antimicrobials. 40<sup>th</sup> Interscience on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2000. Abstract 518. Toronto. Canada.
169. Keen SL, Denton M, Kerr KG. Temperature-dependent susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* to ciprofloxacin and trovafloxacin. J Antimicrob Chemother. 1999;44(SuplA):139.
170. Fuentes F., Sevillano D., Alou L., Bugella J.H., Laguna B. *Temperature-dependent susceptibility of Stenotrophomonas maltophilia to quinolones*. 3<sup>rd</sup> European Congress of Chemotherapy. 2000. Rev Esp Quimioter. 2000;13 ( Supl. 2): abstract M 155.
171. Muder RR. Optimizing therapy for *Stenotrophomonas maltophilia*. Semin Respir Crit Care Med. 2007 Dec;28(6):672-7.



172. Falagas ME, Valkimadi PE, Huang YT, Matthaiou DK, Hsueh PR. Therapeutic options for *Stenotrophomonas maltophilia* infections beyond co-trimoxazole: a systematic review. J Antimicrob Chemother. 2008 Nov;62(5):889-94.
173. Pankey GA, Sabath LD. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. Clin Infect Dis. 2004 Mar 15;38(6):864-70.
174. Korzets A, Ori Y, Rudnicki C, Chagnac A, Weinstein T, Herman M, Zevin D, Gaftor U. *Xanthomonas maltophilia*-a growing problem in the haemodialysis population. Nephrol Dial Transplant. 1997 Oct;12(10):2174-6.
175. Zelenitsky SA, Iacovides H, Ariano RE, Harding GK. Antibiotic combinations significantly more active than monotherapy in an in vitro infection model of *Stenotrophomonas maltophilia*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005 Jan;51(1):39-43.
176. Mendoza DL, Darin M, Waterer GW, Wunderink RG. Update on *Stenotrophomonas maltophilia* infection in the ICU. Clin Pulm Med. 2007;14:17-22.
177. Muñoz JL, Garcia MI, Munoz S, Leal S, Fajardo M, Garcia-Rodriguez JA. Activity of trimethoprim/sulfamethoxazole plus polymyxin B against multiresistant *Stenotrophomonas maltophilia*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996 Nov;15(11):879-82.
178. Yilmaz M, Celik AF, Mert A. Successfully treated nosocomial *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia following desensitization to trimethoprim-sulfamethoxazole. J Infect Chemother. 2007 Apr;13(2):122-3.
179. Landrum ML, Conger NG, Forgione MA. Trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of *Stenotrophomonas maltophilia* osteomyelitis. Clin Infect Dis. 2005 May 15;40(10):1551-2.
180. Giacometti A, Cirioni O, Del Prete MS, Barchiesi F, Fortuna M, Drenaggi D, Scalise G. In vitro activities of membrane-active peptides alone and in combination with clinically used antimicrobial agents against *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Jun;44(6):1716-9.
181. May J, Chan CH, King A, Williams L, French GL. Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. J Antimicrob Chemother. 2000 May;45(5):639-43.
182. Piddock LJ, Johnson M, Ricci V, Hill SL. Activities of new fluoroquinolones against fluoroquinolone-resistant pathogens of the lower respiratory tract. Antimicrob Agents Chemother. 1998 Nov;42(11):2956-60.
183. Kaatz GW, Seo SM. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 1997 Dec;41(12):2733-7.
184. Miyamae S, Nikaido H, Tanaka Y, Yoshimura F. Active efflux of norfloxacin by *Bacteroides fragilis*. Antimicrob Agents Chemother. 1998 Aug;42(8):2119-21.
185. Peterson ML, Hovde LB, Wright DH, Hoang AD, Raddatz JK, Boysen PJ, Rotschafer JC. Fluoroquinolone resistance in *Bacteroides fragilis* following sparfloxacin exposure. Antimicrob Agents Chemother. 1999 Sep;43(9):2251-5.
186. Ribera A, Ruiz J, Jimenez de Anta MT, Vila J. Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. J Antimicrob Chemother. 2002 Apr;49(4):697-8.
187. Ribera A, Jurado A, Ruiz J, Marco F, Del Valle O, Mensa J, Chaves J, Hernández G, Jiménez de Anta MT, Vila J. In vitro activity of cinafloxacin in comparison with other quinolones against *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates in the presence and absence of reserpine. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002 Feb;42(2):123-8.
188. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, Blais J, Cho D, Chamberland S, Renau T, Leger R, Hecker S, Watkins W, Hoshino K, Ishida H, Lee VJ. Identification and

- characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Jan;45(1):105-16.
189. Craig WA. Pharmacodynamics of antimicrobials: General concepts and applications. En: Nightingale CH, Murakawa T, Ambrose PG. *Antimicrobial pharmacodynamics in theory and clinical practice*. Marcel Dekker, New York, 2002: 1-22.
  190. Andes D, van Ogtrop ML, Peng J, Craig WA. In vivo pharmacodynamics of a new oxazolidinone (linezolid). *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Nov;46(11):3484-9.
  191. Vogelman B, Gudmundsson S, Leggett J, Turnidge J, Ebert S, Craig WA. Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *J Infect Dis*. 1988 Oct;158(4):831-47.
  192. Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis*. 1998 Jan;26(1):1-10; quiz 11-2.
  193. Corvaisier S, Maire PH, Bouvier d'Yvoire MY, Barbaut X, Bleyzac N, Jelliffe RW. Comparisons between antimicrobial pharmacodynamic indices and bacterial killing as described by using the Zhi model. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Jul;42(7):1731-7.
  194. Mouton JW. Impact of pharmacodynamics on breakpoint selection for susceptibility testing. *Infect Dis Clin North Am*. 2003 Sep;17(3):579-98.
  195. Drusano GL, Johnson DE, Rosen M, Standiford HC. Pharmacodynamics of a fluoroquinolone antimicrobial agent in a neutropenic rat model of *Pseudomonas sepsis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 Mar;37(3):483-90.
  196. MacGowan A, Rogers C, Holt HA, Wootton M, Bowker K. Assessment of different antibacterial effect measures used in in vitro models of infection and subsequent use in pharmacodynamic correlations for moxifloxacin. *J Antimicrob Chemother*. 2000 Jul;46(1):73-8.
  197. Marchbanks CR, McKiel JR, Gilbert DH, Robillard NJ, Painter B, Zinner SH, Dudley MN. Dose ranging and fractionation of intravenous ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in an in vitro model of infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 Sep;37(9):1756-63.
  198. Madaras-Kelly KJ, Ostergaard BE, Hovde LB, Rotschafer JC. Twenty-four-hour area under the concentration-time curve/MIC ratio as a generic predictor of fluoroquinolone antimicrobial effect by using three strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Mar;40(3):627-32.
  199. Blaser J, Stone BB, Groner MC, Zinner SH. Comparative study with enoxacin and netilmicin in a pharmacodynamic model to determine importance of ratio of antibiotic peak concentration to MIC for bactericidal activity and emergence of resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1987 Jul;31(7):1054-60.
  200. Craig WA. Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of beta-lactams, glycopeptides, and linezolid. *Infect Dis Clin North Am*. 2003 Sep;17(3):479-501.
  201. Andes D, Craig WA. Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. *Int J Antimicrob Agents*. 2002 Apr;19(4):261-8.
  202. Andes D, van Ogtrop ML, Peng J, Craig WA. In vivo pharmacodynamics of a new oxazolidinone (linezolid). *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Nov;46(11):3484-9.
  203. Strukova EN, Smirnova MV, Vostrov SN, Lubenko IY, Firsov AA, Zinner SH, Portnoy YA. Linezolid pharmacodynamics with *Staphylococcus aureus* in an in vitro dynamic model. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Mar;33(3):251-4.
  204. Ambrose PG, Bhavnani SM, Rubino CM, Louie A, Gumbo T, Forrest A, Drusano GL. Pharmacokinetics-pharmacodynamics of antimicrobial therapy: it's not just for mice anymore. *Clin Infect Dis*. 2007 Jan 1;44(1):79-86.

205. Nielsen EI, Cars O, Friberg LE. Pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) indices of antibiotics predicted by a semimechanistic PKPD model: a step toward model-based dose optimization. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Oct;55(10):4619-30.
206. Turnidge J, Paterson DL. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Jul;20(3):391-408.
207. Nielsen EI, Friberg LE. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. *Pharmacol Rev.* 2013 Jun 26;65(3):1053-90.
208. Craig WA. Interrelationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics in determining dosage regimens for broad-spectrum cephalosporins. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1995 May-Jun;22(1-2):89-96.
209. MacGowan A, Bowker K. Developments in PK/PD: optimising efficacy and prevention of resistance. A critical review of PK/PD in in vitro models. *Int J Antimicrob Agents.* 2002 Apr;19(4):291-8.
210. Sevillano D, Alou L, Aguilar L, Echevarria O, Gimenez MJ, Prieto J. Azithromycin iv pharmacodynamic parameters predicting *Streptococcus pneumoniae* killing in epithelial lining fluid versus serum: an in vitro pharmacodynamic simulation. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Jun;57(6):1128-33.
211. Lacy MK, Lu W, Xu X, Tessier PR, Nicolau DP, Quintiliani R, Nightingale CH. Pharmacodynamic comparisons of levofloxacin, ciprofloxacin, and ampicillin against *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro model of infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Mar;43(3):672-7.
212. Esposito S, Noviello S, Ianniello F. Bactericidal activity of moxifloxacin compared to grepafloxacin and clarithromycin against *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* investigated using an in vitro pharmacodynamic model. *J Chemother.* 2000 Dec;12(6):475-81.
213. Zinner SH, Firsov AA, Gilbert D, Simmons K, Lubenko IY. The pharmacodynamics of gatifloxacin and ciprofloxacin for pneumococci in an in vitro dynamic model: prediction of equiefficient doses. *J Antimicrob Chemother.* 2001 Dec;48(6):821-6.
214. MacGowan AP, Bowker KE, Wootton M, Holt HA. Activity of moxifloxacin, administered once a day, against *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro pharmacodynamic model of infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Jul;43(7):1560-4.
215. MacGowan AP, Rogers CA, Holt HA, Bowker KE. Activities of moxifloxacin against, and emergence of resistance in, *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro pharmacokinetic model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Mar;47(3):1088-95.
216. Vesga O, Craig WA. Activity of levofloxacin against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in normal and neutropenic mice. En resumen del 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Sept, 1996, New Orleans, USA.
217. Croisier D, Etienne M, Bergoin E, Charles PE, Lequeu C, Piroth L, Portier H, Chavanet P. Mutant selection window in levofloxacin and moxifloxacin treatments of experimental pneumococcal pneumonia in a rabbit model of human therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 May;48(5):1699-707.
218. Woodnutt G. Pharmacodynamics to combat resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2000 Jul;46 Suppl T1:25-31.
219. Ambrose PG, Grasela DM, Grasela TH, Passarell J, Mayer HB, Pierce PF. Pharmacodynamics of fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* in patients with community-acquired respiratory tract infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Oct;45(10):2793-7.
220. Drusano GL, Preston SL, Hardalo C, Hare R, Banfield C, Andes D, Vesga O, Craig WA. Use of preclinical data for selection of a phase II/III dose for evernimicin and identification of a preclinical MIC breakpoint. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Jan;45(1):13-22.

221. Owens RC Jr, Bhavnani SM, Ambrose PG. Assessment of pharmacokinetic-pharmacodynamic target attainment of gemifloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005 Jan;51(1):45-9.
222. Mouton JW, Brown DF, Apfalter P, Cantón R, Giske CG, Ivanova M, MacGowan AP, Rodloff A, Soussy CJ, Steinbakk M, Kahlmeter G. The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Mar;18(3):E37-45.
223. Forrest A, Chodosh S, Amantea MA, Collins DA, Schentag JJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral grepafloxacin in patients with acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis. *J Antimicrob Chemother*. 1997 Dec;40 Suppl A:45-57.
224. MacGowan AP, Reynolds R, Noel AR, Bowker KE. Bacterial strain-to-strain variation in pharmacodynamic index magnitude, a hitherto unconsidered factor in establishing antibiotic clinical breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Dec;53(12):5181-4.
225. EMEA. Points to Consider on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in the Development of Antibacterial Medicinal Products. CPMP/EWP/2655/99. 2000.
226. FDA. Guidance for Industry. Developing Antimicrobial Drugs—General Considerations for Clinical Trials (Draft Guidance) 1998.
227. Nicolau DP, McNabb J, Lacy MK, Quintiliani R, Nightingale CH. Continuous versus intermittent administration of ceftazidime in intensive care unit patients with nosocomial pneumonia. *Int J Antimicrob Agents*. 2001 Jun;17(6):497-504.
228. Alou L, Aguilar L, Sevillano D, Gimenez MJ, Echeverria O, Gomez-Lus ML, Prieto J. Is there a pharmacodynamic need for the use of continuous versus intermittent infusion with ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa*? An in vitro pharmacodynamic model. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Feb;55(2):209-13.
229. Lodise TP Jr, Lomaestro B, Drusano GL. Piperacillin-tazobactam for *Pseudomonas aeruginosa* infection: clinical implications of an extended-infusion dosing strategy. *Clin Infect Dis*. 2007 Feb 1;44(3):357-63.
230. Dagan R, Hoberman A, Johnson C, Leibovitz EL, Arguedas A, Rose FV, Wynne BR, Jacobs MR. Bacteriologic and clinical efficacy of high dose amoxicillin/clavulanate in children with acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J*. 2001 Sep;20(9):829-37
231. Sevillano D, Calvo A, Gimenez MJ, Alou L, Aguilar L, Valero E, Carcas A, Prieto J. Bactericidal activity of amoxicillin against non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro pharmacodynamic model simulating the concentrations obtained with the 2000/125 mg sustained-release co-amoxiclav formulation. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Dec;54(6):1148-51.
232. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fifth informational supplement. CLSI/NCCLS document M100-S25. CLSI, Wayne, PA, USA, 2015.
233. EUCAST. Clinical Breakpoints. [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints).
234. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Apr;8(4):260-71.
235. Firsov AA, Vostrov SN, Lubenko IY, Drlica K, Portnoy YA, Zinner SH. In vitro pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluorquinolones against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 May;47(5):1604-1613.
236. Zinner SH, Lubenko IY, Gilbert D, Simmons K, Zhao X, Drlica K, Firsov AA.. Emergence of resistant *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro dynamic model that simulates moxifloxacin concentrations inside and outside the mutant selection window: related changes in susceptibility, resistance frequency and bacterial killing. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Oct;52(4):616-22.
237. Peloquin CA, Cumbo TJ, Nix DE, Sands MF, Schentag JJ. Evaluation of intravenous ciprofloxacin in patients with nosocomial lower respiratory tract infections. Impact of plasma concentrations,

- organism, minimum inhibitory concentration, and clinical condition on bacterial eradication. Arch Intern Med. 1989 Oct;149(10):2269-73.
238. Drusano GL. Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of 'bug and drug'. Nat Rev Microbiol. 2004 Apr;2(4):289-300.
  239. Ambrose PG, Bhavnani SM, Owens RC Jr. Clinical pharmacodynamics of quinolones. Infect Dis Clin North Am. 2003 Sep;17(3):529-43.
  240. Preston SL, Drusano GL, Berman AL, Fowler CL, Chow AT, Dornseif B, Reichl V, Natarajan J, Wong FA, Corrado M. Levofloxacin population pharmacokinetics and creation of a demographic model for prediction of individual drug clearance in patients with serious community-acquired infection. Antimicrob Agents Chemother. 1998 May;42(5):1098-104.
  241. Lister PD, Sanders CC. Pharmacodynamics of levofloxacin and ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 1999 Jan;43(1):79-86.
  242. Martinez JL, Baquero F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Jul;44(7):1771-7.
  243. Tam VH, Louie A, Deziel MR, Liu W, Drusano GL. The relationship between quinolone exposures and resistance amplification is characterized by an inverted U: a new paradigm for optimizing pharmacodynamics to counterselect resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Feb;51(2):744-7.
  244. Jumbe N, Louie A, Leary R, Liu W, Deziel MR, Tam VH, Bachhawat R, Freeman C, Kahn JB, Bush K, Dudley MN, Miller MH, Drusano GL. Application of a mathematical model to prevent in vivo amplification of antibiotic-resistant bacterial populations during therapy. J Clin Invest. 2003 Jul;112(2):275-85.
  245. Gloede J, Scheerans C, Derendorf H, Kloft C. In vitro pharmacodynamic models to determine the effect of antibacterial drugs. J Antimicrob Chemother. 2010 Feb;65(2):186-201.
  246. Dudley MN, Griffith D. Animal models of infection for the study antibiotic pharmacodynamics. In: Nightingale CH, Murakawa T, Ambrose PG, Eds. Antimicrobial pharmacodynamic in theory and clinical practice. New York, NY: Marcel Dekker Inc; 2002: 67-98.
  247. Dalhoff A, MacGowan AP, Cars O, Wiedemann B, Ullmann U, Bauerfeind A, Schmidt A. Comparative evaluation of seven different in vitro pharmacodynamic models of infection. En resumen del 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Sept, 2003, Chicago, Ill, USA.
  248. MacGowan A, Rogers C, Bowker K. In vitro models, in vivo models, and pharmacokinetics: what can we learn from in vitro models? Clin Infect Dis. 2001 Sep 15;33 Suppl 3:S214-20.
  249. Greenwood D, O'Grady F. Potent combinations of beta-lactam antibiotics using the beta-lactamase inhibition principle. Chemotherapy. 1975;21(6):330-41.
  250. Bauerfeind A. Pharmacodynamics of levofloxacin and ofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. J Antimicrob Chemother; 1999: 43 (supl. C): 77-82.
  251. Balcabao IP, Aguilar L, Martin M, Garcia Y, Dal-Re R, Prieto J. Activities against *Streptococcus pneumoniae* of amoxicillin and cefotaxime at physiological concentrations: in vitro pharmacodynamic simulation. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40: 2904-6.
  252. Alou L, Sevillano D, Bugella JH, Fuentes F, Gomez-Lus ML, Prieto J. Evaluation of two in vitro pharmacodynamic simulation models: microfiltration versus centrifugation-filtration. Int J Antimicrob Agents. 2001 May;17(5):365-70.
  253. Grasso S, Meinardi G, de Carneri I, Tamassia V. New in vitro model to study the effect of antibiotic concentration and rate of elimination on antibacterial activity. Antimicrob Agents Chemother. 1978 Apr;13(4):570-6.

254. Firsov AA, Shevchenko AA, Vostrov SN, Zinner SH. Inter- and intraquinolone predictors of antimicrobial effect in an in vitro dynamic model: new insight into a widely used concept. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Mar;42(3):659-65.
255. Zabinski RA, Walker KJ, Larsson AJ, Moody JA, Kaatz GW, Rotschafer JC. Effect of aerobic and anaerobic environments on antistaphylococcal activities of five fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Feb;39(2):507-12.
256. Navashin SM, Fomina IP, Firsov AA, Chernykh VM, Kuznetsova SM. A dynamic model for in-vitro evaluation of antimicrobial action by simulation of the pharmacokinetic profiles of antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 1989 Mar;23(3):389-99.
257. Keil S, Wiedemann B. Mathematical corrections for bacterial loss in pharmacodynamic in vitro dilution models. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 May;39(5):1054-8.
258. Shah PM. Activity of imipenem in an in-vitro model simulating pharmacokinetic parameters in human blood. *J Antimicrob Chemother.* 1985 Jan;15 Suppl A:153-7.
259. Cappelletty DM, Kang SL, Palmer SM, Rybak MJ. Pharmacodynamics of ceftazidime administered as continuous infusion or intermittent bolus alone and in combination with single daily-dose amikacin against *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Aug;39(8):1797-801.
260. Manduru M, Mihm LB, White RL, Friedrich LV, Flume PA, Bosso JA. In vitro pharmacodynamics of ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Sep;41(9):2053-6.
261. Blaser J, Stone BB, Zinner SH. Two compartment kinetic model with multiple artificial capillary units. *J Antimicrob Chemother.* 1985 Jan;15 Suppl A:131-7.
262. Zinner SH, Husson M, Klastersky J. An artificial capillary in vitro kinetic model of antibiotic bactericidal activity. *J Infect Dis.* 1981 Dec;144(6):583-7.
263. Boubakar B.B., Bernard A., Iliadis A., Quentin C., Ducint D., Etienne R., Fourtillan M., Maachi Guillot I., Saux M.C. New approach for accurate simulation of human pharmacokinetics in an in vitro pharmacodynamic model: application to ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 47: 223-227.
264. Sevillano D, Aguilar L, Alou L, Giménez MJ, González N, Torrico M, Cafini F, Garcia-Rey C, Garcia-Escribano N, Prieto J. Exposure-response analysis of tigecycline in pharmacodynamic simulations using different size inocula of target bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 2010 Aug;36(2):137-44.
265. Nickel JC, Wright JB, Ruseska I, Marrie TJ, Whitfield C, Costerton JW. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* colonizing a urinary catheter in vitro. *Eur J Clin Microbiol.* 1985 Apr;4(2):213-8.
266. McGrath BJ, Kang SL, Kaatz GW, Rybak MJ. Bactericidal activities of teicoplanin, vancomycin, and gentamicin alone and in combination against *Staphylococcus aureus* in an in vitro pharmacodynamic model of endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994 Sep;38(9):2034-40.
267. Hulten K, Rigo R, Gustafsson I, Engstrand L. New pharmacokinetic in vitro model for studies of antibiotic activity against intracellular microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 Dec;40(12):2727-31.
268. MacGowan AP, Bowker KE, Wootton M, Holt HA. The in vitro activity of moxifloxacin against *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* explored using a pharmacodynamic model. *Clin Microbiol Infect.* 1999 Apr;5(4):195-200.
269. Firsov AA, Vostrov SN, Shevchenko AA, Cornaglia G. Parameters of bacterial killing and regrowth kinetics and antimicrobial effect examined in terms of area under the concentration-time curve relationships: action of ciprofloxacin against *Escherichia coli* in an in vitro dynamic model. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Jun;41(6):1281-7.

270. Forrest A, Nix DE, Ballow CH, Goss TF, Birmingham MC, Schentag JJ. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 May;37(5):1073-81.
271. Rustige C., Wiedeman B. Antibacterial activity of lomefloxacin in a pharmacokinetic in vitro model. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1107-11).
272. Aeschlimann JR, Kaatz GW, Rybak MJ. The effects of NorA inhibition on the activities of levofloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin against two genetically related strains of *Staphylococcus aureus* in an in-vitro infection model. *J Antimicrob Chemother.* 1999 Sep;44(3):343-9.
273. Alou L, Aguilar L, Sevillano D, Gimenez MJ, Laguna B, Echeverria O, Carcas A, Lubomirov R, Casal J, Prieto J. Effect of opsonophagocytosis mediated by specific antibodies on the co-amoxiclav serum bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae* after administration of a single oral dose of pharmacokinetically enhanced 2000/125 mg co-amoxiclav to healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother.* 2005 May;55(5):742-7.
274. Kang SL, Rybak MJ, McGrath BJ, Kaatz GW, Seo SM. Pharmacodynamics of levofloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, alone and in combination with rifampin, against methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* in an in vitro infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994 Dec;38(12):2702-9
275. Firsov AA, Mattie H. Relationships between antimicrobial effect and area under the concentration-time curve as a basis for comparison of modes of antibiotic administration: meropenem bolus injections versus continuous infusions. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Feb;41(2):352-6.
276. Lister PD. Pharmacodynamics of gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro pharmacokinetic model: impact of area under the curve/MIC ratios on eradication. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Jan;46(1):69-74.
277. Zinner SH, Vostrov SN, Alferova IV, Lubenko IY, Portnoy YA, Firsov AA. Comparative pharmacodynamics of the new fluoroquinolone ABT492 and ciprofloxacin with *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro dynamic model. *Int J Antimicrob Agents.* 2004 Aug;24(2):173-7.
278. Madaras-Kelly KJ, Daniels C, Hegbloom M, Thompson M. Pharmacodynamic characterization of efflux and topoisomerase IV-mediated fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2002 Aug;50(2):211-8.
279. Madaras-Kelly KJ, Demasters TA. In vitro characterization of fluoroquinolone concentration/MIC antimicrobial activity and resistance while simulating clinical pharmacokinetics of levofloxacin, ofloxacin, or ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000 Aug;37(4):253-60.
280. Firsov AA, Smirnova MV, Strukova EN, Vostrov SN, Portnoy YA, Zinner SH. Enrichment of resistant *Staphylococcus aureus* at ciprofloxacin concentrations simulated within the mutant selection window: bolus versus continuous infusion. *Int J Antimicrob Agents.* 2008 Dec;32(6):488-93.
281. Firsov AA, Lubenko IY, Smirnova MV, Strukova EN, Zinner SH. Enrichment of fluoroquinolone-resistant *Staphylococcus aureus*: oscillating ciprofloxacin concentrations simulated at the upper and lower portions of the mutant selection window. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Jun;52(6):1924-8.
282. Firsov AA, Smirnova MV, Lubenko IY, Vostrov SN, Portnoy YA, Zinner SH. Testing the mutant selection window hypothesis with *Staphylococcus aureus* exposed to daptomycin and vancomycin in an in vitro dynamic model. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Dec;58(6):1185-92.
283. Smirnova MV, Vostrov SN, Strukova EV, Dovzhenko SA, Kobrin MB, Portnoy YA, Zinner SH, Firsov AA. The impact of duration of antibiotic exposure on bacterial resistance predictions using in vitro dynamic models. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Oct;64(4):815-20.
284. Zhao X, Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies. *Clin Infect Dis.* 2001 Sep 15;33 Suppl 3:S147-56.

285. Rouse, M. S., B. M. Tallan, N. K. Henry, J. M. Steckelberg, and W. R. Wilson. 1991. Treatment of *Xanthomonas maltophilia* experimental pneumonia. *Chest* 12(Suppl.):147S.
286. Valdezate S, Vindel A, Martín-Dávila P, Del Saz BS, Baquero F, Cantón R. High genetic diversity among *Stenotrophomonas maltophilia* strains despite their originating at a single hospital. *J Clin Microbiol.* 2004 Feb;42(2):693-9.
287. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J C Microbiol.* 1995 Sep;33(9):2233-9.
288. Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Oct;76(10):5269-73.
289. NCCLS. Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters: Approved Standard. NCCLS document M23-A2. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2000.
290. Fish DN, Chow AT. The clinical pharmacokinetics of levofloxacin. *Clin Pharmacokinet.* 1997 Feb;32(2):101-19.
291. Chien SC, Rogge MC, Gisclon LG, Curtin C, Wong F, Natarajan J, Williams RR, Fowler CL, Cheung WK, Chow AT. Pharmacokinetic profile of levofloxacin following once-daily 500-milligram oral or intravenous doses. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Oct;41(10):2256-60.
292. Lee LJ, Hafkin B, Lee ID, Hoh J, Dix R. Effects of food and sucralfate on a single oral dose of 500 milligrams of levofloxacin in healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Oct;41(10):2196-200.
293. Andrews JM, Honeybourne D, Jevons G, Brenwald NP, Cunningham B, Wise R. Concentrations of levofloxacin (HR 355) in the respiratory tract following a single oral dose in patients undergoing fibre-optic bronchoscopy. *J Antimicrob Chemother.* 1997 Oct;40(4):573-7.
294. Stass H, Dalhoff A, Kubitz D, Schuhly U. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of ascending single doses of moxifloxacin, a new 8-methoxy quinolone, administered to healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Aug;42(8):2060-5.
295. Muller M, Stass H, Brunner M, Moller JG, Lackner E, Eichler HG. Penetration of moxifloxacin into peripheral compartments in humans. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Oct;43(10):2345-9.
296. Stass H, Kubitz D, Halabi A, Delesen H. Pharmacokinetics of moxifloxacin, a novel 8-methoxy-quinolone, in patients with renal dysfunction. *Br J Clin Pharmacol.* 2002 Mar;53(3):232-7.
297. Lober S, Ziege S, Rau M, Schreiber G, Mignot A, Koeppe P, Lode H. Pharmacokinetics of gatifloxacin and interaction with an antacid containing aluminum and magnesium. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 May;43(5):1067-71.
298. Wise R, Andrews JM, Ashby JP, Marshall J. A study to determine the pharmacokinetics and inflammatory fluid penetration of gatifloxacin following a single oral dose. *J Antimicrob Chemother.* 1999 Nov;44(5):701-4.
299. Akaike. Posterior probabilities for choosing a regression model. *Annals of the Institute of Mathematical Statistics* 1978;30:A9-14.
300. Schwinghammer TL, Kroboth PD. Basic concepts in pharmaco-dynamic modeling. *J Clin Pharmacol.* 1988 May;28(5):388-94.
301. Motulshy HJ and Christopoulos A. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. 2003. GraphPad Software Inc. San Diego CA. USA. [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).
302. Sullivan JT, Woodruff M, Lettieri J, Agarwal V, Krol GJ, Leese PT, Watson S, Heller AH. Pharmacokinetics of a once-daily oral dose of moxifloxacin (Bay 12-8039), a new enantiomerically pure 8-methoxy quinolone. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Nov;43(11):2793-7.



303. Stass H, Bottcher MF, Ochmann K. Evaluation of the influence of antacids and H<sub>2</sub> antagonists on the absorption of moxifloxacin after oral administration of a 400mg dose to healthy volunteers. *Clin Pharmacokinet.* 2001;40 Suppl 1:39-48.
304. Soman A, Honeybourne D, Andrews J, Jevons G, Wise R. Concentrations of moxifloxacin in serum and pulmonary compartments following a single 400 mg oral dose in patients undergoing fibre-optic bronchoscopy. *J Antimicrob Chemother.* 1999 Dec;44(6):835-8.
305. Avelox. Ficha técnica 2008. <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/Safety-RelatedDrugLabelingChanges/ucm113864.htm>
306. Demiraslan H, Sevim M, Pala Ç, Durmaz S, Berk V, Kaynar L, Metan G. Risk factors influencing mortality related to *Stenotrophomonas maltophilia* infection in hematology-oncology patients. *Int J Hematol.* 2013 Mar;97(3):414-20.
307. Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009-2012. *Int J Antimicrob Agents.* 2014 Apr;43(4):328-34.
308. Livermore DM, Hope R, Brick G, Lillie M, Reynolds R; BSAC Working Parties on Resistance Surveillance. Non-susceptibility trends among *Pseudomonas aeruginosa* and other non-fermentative Gram-negative bacteria from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Nov;62 Suppl 2:ii55-63.
309. Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, Woodford N. Comparative in vitro activity of sulfametrole/trimethoprim and sulfamethoxazole/trimethoprim and other agents against multiresistant Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Apr;69(4):1050-6.
310. Memish ZA, Shibl AM, Kambal AM, Ohaly YA, Ishaq A, Livermore DM. Antimicrobial resistance among non-fermenting Gram-negative bacteria in Saudi Arabia. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Jul;67(7):1701-5.
311. Wu K, Wang F, Sun J, Wang Q, Chen Q, Yu S, Rui Y. Class 1 integron gene cassettes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria in southern China. *Int J Antimicrob Agents.* 2012 Sep;40(3):264-7.
312. Rattanaumpawan P, Ussavasodhi P, Kiratisin P, Aswapokee N. Epidemiology of bacteremia caused by uncommon non-fermentative gram-negative bacteria. *BMC Infect Dis.* 2013 Apr 8;13:167.
313. Rhee JY, Choi JY, Choi MJ, Song JH, Peck KR, Ko KS. Distinct groups and antimicrobial resistance of clinical *Stenotrophomonas maltophilia* complex isolates from Korea. *J Med Microbiol.* 2013 May;62(Pt 5):748-53.
314. Flores-Treviño S, Gutiérrez-Ferman JL, Morfín-Otero R, Rodríguez-Noriega E, Estrada-Rivadeneira D, Rivas-Morales C, Llaca-Díaz JM, Camacho-Ortiz A, Mendoza-Olazarán S, Garza-González E. *Stenotrophomonas maltophilia* in Mexico: antimicrobial resistance, biofilm formation and clonal diversity. *J Med Microbiol.* 2014 Nov;63(Pt 11):1524-30.
315. Hotta G, Matsumura Y, Kato K, Nakano S, Yunoki T, Yamamoto M, Nagao M, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S. Risk factors and outcomes of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia: a comparison with bacteraemia caused by *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *PLoS One.* 2014 Nov 6;9(11).
316. García-Rodríguez JA, García Sánchez JE, García García MI, García Sánchez E, Muñoz Bellido JL. Antibiotic susceptibility profile of *Xanthomonas maltophilia*. In vitro activity of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1991 May-Jun;14(3):239-43.
317. Insa R, Cercenado E, Goyanes MJ, Morente A, Bouza E. In vitro activity of tigecycline against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Mar;59(3):583-5.

318. Daikos GL, Kosmidis C, Tassios PT, Petrikkos G, Vasilakopoulou A, Psychogiou M, Stefanou I, Avlami A, Katsilambros N. Enterobacteriaceae bloodstream infections: presence of integrons, risk factors, and outcome. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jul;51(7):2366-72.
319. Fadda G, Spanu T, Ardito F, Taddei C, Santangelo R, Siddu A, Ciccaglione D; Italian Epidemiological Observatory. Antimicrobial resistance among non-fermentative Gram-negative bacilli isolated from the respiratory tracts of Italian inpatients: a 3-year surveillance study by the Italian Epidemiological Survey. *Int J Antimicrob Agents*. 2004 Mar;23(3):254-61.
320. Tekçe YT, Erbay A, Cabadak H, Sen S. Tigecycline as a therapeutic option in *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *J Chemother*. 2012 Jun;24(3):150-4.
321. Pradhananga SL, Rowling PJ, Simpson IN, Payne DJ. Sensitivity of L-2 type beta-lactamases from *Stenotrophomonas maltophilia* to serine active site beta-lactamase inhibitors. *J Antimicrob Chemother*. 1996 Feb;37(2):394-6.
322. Felici A, Amicosante G. Kinetic analysis of extension of substrate specificity with *Xanthomonas maltophilia*, *Aeromonas hydrophila*, and *Bacillus cereus* metallo-beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Jan;39(1):192-9.
323. Barbier-Frebour N, Boutiba-Boubake I, Nouvello M, Lemelan J. Molecular investigation of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates exhibiting rapid emergence of ticarcillin-clavulanate resistance. *J Hosp Infect*. 2000 May;45(1):35-41.
324. Hu RM, Huang KJ, Wu LT, Hsiao YJ, Yang TC. Induction of L1 and L2 beta-lactamases of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Mar;52(3):1198-200.
325. Crowder MW, Walsh TR, Banovic L, Pettit M, Spencer J. Overexpression, purification, and characterization of the cloned metallo-beta-lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Apr;42(4):921-6.
326. MT López, D. Sevillano, L Alou, M.Torrico, N. González, ML Gómez-Lus. Cefepima (CFP) 2000 mg en combinación con amoxicilina-ác. clavulánico (A/C) 1000-200 mg es eficaz frente a *s. maltophilia* resistente a ticarcilina-ácido clavulánico (T/C) y cotrimoxazol (TMP/SMX). *Rev. Esp. Quimioter*. 2007. Dic. Supl.
327. Canton R, Valdezate S, Vindel A, Sanchez Del Saz B, Maiz L, Baquero F. Antimicrobial susceptibility profile of molecular typed cystic fibrosis *Stenotrophomonas maltophilia* isolates and differences with noncystic fibrosis isolates. *Pediatr Pulmonol*. 2003 Feb;35(2):99-107.
328. Castanheira M, Mendes RE, Jones RN. Update on *Acinetobacter* species: mechanisms of antimicrobial resistance and contemporary in vitro activity of minocycline and other treatment options. *Clin Infect Dis*. 2014 Dec 1;59 Suppl 6:S367-73.
329. San Gabriel P, Zhou J, Tabibi S, Chen Y, Trauzzi M, Saiman L. Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jan;48(1):168-71.
330. Milne KE, Gould IM. Combination antimicrobial susceptibility testing of multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Aug;56(8):4071-7.
331. Rizek C, Ferraz JR, van der Heijden IM, Giudice M, Mostachio AK, Paez J, Carrilho C, Levin AS, Costa SF. In vitro activity of potential old and new drugs against multidrug-resistant gram-negatives. *J Infect Chemother*. 2015 Feb;21(2):114-7.
332. Stein GE. New drugs to treat skin and soft tissue infections. *Curr Infect Dis Rep*. 2007 Sep;9(5):408-14.
333. Wu Y, Shao Z. High-dosage tigecycline for *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. *Chin Med J (Engl)*. 2014;127(17):3199.

334. Falagas ME, Vardakas KZ, Tsiveriotis KP, Triarides NA, Tansarli GS. Effectiveness and safety of high-dose tigecycline-containing regimens for the treatment of severe bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 Jul;44(1):1-7.
335. Chang YT, Lin CY, Lu PL, Lai CC, Chen TC, Chen CY, Wu DC, Wang TP, Lin CM, Lin WR, Chen YH. *Stenotrophomonas maltophilia* bloodstream infection: comparison between community-onset and hospital-acquired infections. *J Microbiol Immunol Infect*. 2014 Feb;47(1):28-35.
336. Pien CJ, Kuo HY, Chang SW, Chen PR, Yeh HW, Liu CC, Liou ML. Risk factors for levofloxacin resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* from respiratory tract in a regional hospital. *J Microbiol Immunol Infect*. 2015 Jun;48(3):291-5.
337. Capitano B, Mattoes HM, Shore E, O'Brien A, Braman S, Sutherland C, Nicolau DP. Steady-state intrapulmonary concentrations of moxifloxacin, levofloxacin, and azithromycin in older adults. *Chest*. 2004 Mar;125(3):965-73.
338. Honeybourne D, Banerjee D, Andrews J, Wise R. Concentrations of gatifloxacin in plasma and pulmonary compartments following a single 400 mg oral dose in patients undergoing fibre-optic bronchoscopy. *J Antimicrob Chemother*. 2001 Jul;48(1):63-6.
339. Peleman RA, Van De Velde V, Germonpre PR, Fleurinck C, Rosseel MT, Pauwels RA. Trovafloxacin concentrations in airway fluids of patients with severe community-acquired pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Jan;44(1):178-80.
340. Cho SY, Kang CI, Kim J, Ha YE, Chung DR, Lee NY, Peck KR, Song JH. Can levofloxacin be a useful alternative to trimethoprim-sulfamethoxazole for treating *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia?. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(1):581-3.
341. Wang YL, Scipione MR, Dubrovskaya Y, Papadopoulos J. Monotherapy with fluoroquinolone or trimethoprim-sulfamethoxazole for treatment of *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(1):176-82.
342. Maciá MD, Borrell N, Pérez JL, Oliver A. Detection and susceptibility testing of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains with the Etest and disk diffusion. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jul;48(7):2665-72.
343. Craig WA, Bhavnani SM, Ambrose PG. The inoculum effect: fact or artifact?. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004 Dec;50(4):229-30.
344. MacGowan AP, Noel AR, Rogers CA, Bowker KE. Antibacterial effects of amoxicillin-clavulanate against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* strains for which MICs are high, in an in vitro pharmacokinetic model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jul;48(7):2599-603.
345. Sánchez MB, Martínez JL. The efflux pump SmeDEF contributes to trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Jul;59(7):4347-8.
346. García-León G, Ruiz de Alegría Puig C, García de la Fuente C, Martínez-Martínez L, Martínez JL, Sánchez MB. High-level quinolone resistance is associated with the overexpression of smeVWX in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2015 May;21(5):464-7.
347. Fajardo A, Martínez-Martín N, Mercadillo M, Galán JC, Ghysels B, Matthijs S, Cornelis P, Wiehlmann L, Tümmeler B, Baquero F, Martínez JL. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS One*. 2008 Feb 20;3(2):e1619.
348. Sanchez MB, Hernandez A, Martinez JL. *Stenotrophomonas maltophilia* drug resistance. *Future Microbiol*. 2009 Aug;4(6):655-60.
349. García-León G, Salgado F, Oliveros JC, Sánchez MB, Martínez JL. Interplay between intrinsic and acquired resistance to quinolones in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Environ Microbiol*. 2014 May;16(5):1282-96.
350. Sánchez MB, Martínez JL. SmQnr contributes to intrinsic resistance to quinolones in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jan;54(1):580-1.

351. García-León G, Sánchez MB, Martínez JL. The Inactivation of intrinsic antibiotic resistance determinants widens the mutant selection window for quinolones in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Dec;56(12):6397-9.
352. Pak TR, Altman DR, Attie O, Sebra R, Hamula CL, Lewis M, Deikus G, Newman LC, Fang G, Hand J, Patel G, Wallach F, Schadt EE, Huprikar S, van Bakel H, Kasarskis A, Bashir A. Whole-Genome Sequencing Identifies Emergence of a Quinolone Resistance Mutation in a Case of *Stenotrophomonas maltophilia* Bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Nov;59(11):7117-20.
353. Martin RG, Bartlett ES, Rosner JL, Wall ME. Activation of the *Escherichia coli* marA/soxS/rob regulon in response to transcriptional activator concentration. *J Mol Biol*. 2008 Jul 4;380(2):278-84.
354. Alonso A, Morales G, Escalante R, Campanario E, Sastre L, Martinez JL. Overexpression of the multidrug efflux pump SmeDEF impairs *Stenotrophomonas maltophilia* physiology. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Mar;53(3):432-4.
355. Chang LL, Chen HF, Chang CY, Lee TM, Wu WJ. Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Mar;53(3):518-21.
356. Mima T, Kohira N, Li Y, Sekiya H, Ogawa W, Kuroda T, Tsuchiya T. Gene cloning and characteristics of the RND-type multidrug efflux pump MuxABC-OpmB possessing two RND components in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 2009 Nov;155(Pt 11):3509-17.
357. Sánchez P, Le U, Martínez JL. The efflux pump inhibitor Phe-Arg-beta-naphthylamide does not abolish the activity of the *Stenotrophomonas maltophilia* SmeDEF multidrug efflux pump. *Antimicrob Chemother*. 2003 Apr;51(4):1042-5.
358. Zhang L, Li XZ, Poole K. Fluoroquinolone susceptibilities of efflux-mediated multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia*. *J Antimicrob Chemother*. 2001 Oct;48(4):549-52.
359. Huang YW, Hu RM, Chu FY, Lin HR, Yang TC. Characterization of a major facilitator superfamily (MFS) tripartite efflux pump EmrCABsm from *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Nov;68(11):2498-505.
360. Baquero F, Negri MC. Selective compartments for resistant microorganisms in antibiotic gradients. *Bioessays*. 1997 Aug;19(8):731-6.
361. MacGowan AP, Rogers CA, Holt HA, Wootton M, Bowker KE. Pharmacodynamics of gemifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro pharmacokinetic model of infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Oct;45(10):2916-21.
362. Noel AR, Bowker KE, Macgowan AP. Pharmacodynamics of moxifloxacin against anaerobes studied in an in vitro pharmacokinetic model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Oct;49(10):4234-9.
363. van Ogtrop ML, Andes D, Stamstad TJ, Conklin B, Weiss WJ, Craig WA, Vesga o. In vivo pharmacodynamic activities of two glycyliclins (GAR-936 and WAY 152,288) against various gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Apr;44(4):943-9.
364. Firsov AA, Portnoy YA, Strukova EN, Shlykova DS, Zinner SH. Predicting bacterial resistance using the time inside the mutant selection window: possibilities and limitations. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 Oct;44(4):301-5.
365. Peterson ML, Hovde LB, Wright DH, Brown GH, Hoang AD, Rotschafer JC. Pharmacodynamics of trovafloxacin and levofloxacin against *Bacteroides fragilis* in an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Jan;46(1):203-10.
366. Firsov AA, Golikova MV, Strukova EN, Portnoy YA, Romanov AV, Edelstein MV, Zinner SH. In vitro resistance studies with bacteria that exhibit low mutation frequencies: prediction of "antimutant" linezolid concentrations using a mixed inoculum containing both susceptible and resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Feb;59(2):1014-9.

367. Ferran AA, Kesteman AS, Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of the influence of inoculum size on the selection of resistance in *Escherichia coli* by a quinolone in a mouse thigh bacterial infection model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Aug;53(8):3384-90.
368. Ni W, Song X, Cui J. Testing the mutant selection window hypothesis with *Escherichia coli* exposed to levofloxacin in a rabbit tissue cage infection model. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Mar;33(3):385-9.
369. Gumbo T, Louie A, Liu W, Brown D, Ambrose PG, Bhavnani SM, Drusano GL. Isoniazid bactericidal activity and resistance emergence: integrating pharmacodynamics and pharmacogenomics to predict efficacy in different ethnic populations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jul;51(7):2329-36.
370. Campion JJ, McNamara PJ, Evans ME. Pharmacodynamic modeling of ciprofloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jan;49(1):209-19.
371. Cui J, Liu Y, Wang R, Tong W, Drlica K, Zhao X. The mutant selection window in rabbits infected with *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2006 Dec 1;194(11):1601-8.
372. Rotstein C, Evans G, Born A, Grossman R, Light RB, Magder S, McTaggart B, Weiss K, Zhanel GG. Clinical practice guidelines for hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia in adults. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2008 Jan;19(1):19-53.
373. Sevillano D, Gimenez MJ, Alou L, Aguilar L, Cafini F, et al. (2007) Effects of human albumin and serum on the in vitro bactericidal activity of cefditoren against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 60: 156–158.
374. Cafini F, Aguilar L, González N, Giménez MJ, Torrico M, Alou L, Sevillano D, Vallejo P, Prieto J. In vitro effect of the presence of human albumin or human serum on the bactericidal activity of daptomycin against strains with the main resistance phenotypes in Gram-positives. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Jun;59(6):1185-9.
375. Sevillano D, Aguilar L, Alou L, Giménez MJ, González N, Torrico M, Cafini F, Fenoll A, Coronel P, Prieto J. High protein binding and cidal activity against penicillin-resistant *S. pneumoniae*: a cefditoren in vitro pharmacodynamic simulation. *PLoS One*. 2008 Jul 23;3(7):e2717.
376. Alou L, Giménez MJ, Cafini F, Aguilar L, Sevillano D, González N, Torrico M, Prieto J, García-Rey C, García-Escribano N. In vitro effect of physiological concentrations of human albumin on the antibacterial activity of tigecycline. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Dec;64(6):1230-3.
377. Torrico M, Giménez MJ, González N, Alou L, Sevillano D, Cafini F, Prieto J, Cleeland R, Aguilar L. Bactericidal activity of daptomycin versus vancomycin in the presence of human albumin against vancomycin-susceptible but tolerant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with daptomycin minimum inhibitory concentrations of 1-2microg/mL. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Feb;35(2):131-7.
378. Torrico M, Aguilar L, Sevillano D, Giménez MJ, Alou L, González N, Cafini F, Cleeland R, Prieto J. Activity of simulated serum concentrations of daptomycin versus vancomycin during the first 24h of treatment in the presence of physiological albumin concentrations against vancomycin-susceptible, -tolerant or -intermediate-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 Apr;37(4):332-8.
379. Moellering RC, Eliopoulos GM (2005) Principles of anti-infective therapy. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett principles and practice of infectious diseases*, 6th edn. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone. pp. 242–253.